

**VERGLEICHENDE
UNTERSUCHUNG ZUR SEKUNDÄRSTOFFBILDUNG
BEI FREIEN
UND IMMOBILISIERTEN PFLANZLICHEN ZELLEN**

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

angenommene **Dissertation**

Bernd Martin
geb. am 25. 2. 52 in Verden/Aller

1987

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUR SEKUNDÄRSTOFFBILDUNG

BEI FREIEN UND IMMOBILISIERTEN PFLANZLICHEN

ZELLEN

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

BERND MARTIN

geb. am 25.12.52 in Verden/Aller

1987

Druckort: Oldenburg

Druckjahr: 1987

Tag der Drucklegung: 1. Juli 1987

Erstreferent: Prof. Dr. R. Megnet

Korreferent: Prof. Dr. P. Janiesch

Tag der Disputation: 1. Juli 1987

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Naturstoffproduktion mit pflanzlichen Zellkulturen	1
1.2.	Immobilisierung pflanzlicher Zellkulturen	4
1.3.	Permeabilisierung pflanzlicher Zellkulturen	5
1.4.	Problemstellung	6
2.	<u>Material und Methoden</u>	9
2.1.	Material	9
2.1.1.	Zellkulturen	9
2.1.3.	Medien und Lösungen	9
2.2.	Methoden	11
2.2.1.	Stammhaltung	11
2.2.2.	Bestimmung der Wachstumsrate	12
2.2.3.	Vitalitätsbestimmung	12
2.2.4.	Immobilisierung in Alginat	12
2.2.5.	Bestimmung der Zellmasse der immobilisierten Zellen	13
2.2.6.	Bestimmung der Cinnamoylputrescine	13
2.2.7.	Bestimmung der Phenylalaninderivate über Dünnschichtchromatographie	14
2.2.8.	Bestimmung der Hauptalkaloide von <i>Thalictrum rugosum</i>	15
2.2.9.	Bestimmung der Betacyane von <i>Chenopodium rubrum</i>	16
2.2.10.	Permeabilisierung	16
2.2.11.	Isolierung der Mesophyllzellen aus Blättern von <i>Lupinus polyphyllus</i>	16
2.2.12.	GC-MS-Messungen	17

2.2.13.	In-vivo-NMR- Untersuchungen von permeabilisierten und unbehandelten <i>Catharanthus roseus</i> Zellen	18
3.	<u>Ergebnisse</u>	20
3.1.	Cinnamoylputrescine in <i>Nicotiana tabacum</i>	20
3.1.1.	Immobilisierung von Tabakzellen und Kultivierung im MX-Medium	21
3.1.2.	Kinetik von TX1-Zellen im Wachstumsmedium	24
3.1.3.	Cinnamoylputrescinebildung von freien und immobilisierten TX1-Zellen im Produktionsmedium	25
3.1.4.	Aufnahme von L-(U- ¹⁴ C)Phenylalanin durch Tabakzellen	29
3.1.5.	Aufnahme und Einbau von markiertem L-Phenylalanin zu unterschiedlichen Kulturzeiten	33
3.1.6.	Bewertung der Immobilisierungsversuche	37
3.1.7.	Permeabilisierung von Tabakzellen	37
3.1.8.	Permeabilisierung von TX1-Zellen mit 1-Propanol	41
3.1.9.	Ausscheiden von markierten Verbindungen aus TX4-Zellen durch Permeabilisierung	43
3.1.10.	Fütterungsversuche mit permeabilisierten Tabkzellen	46
3.1.11.	Aufklärung der neuen Verbindungen	47
3.1.12.	Aufnahme von markiertem L-Phenylalanin zu unterschiedlichen Kulturzeiten	55
3.1.13.	Zusammenfassung der Ergebnisse mit <i>N. tabacum</i> -Zellen	56
3.2.	<i>Thalictrum rugosum</i>	59
3.2.1.	Etablierung und Charakterisierung einer feinen Suspensionskultur	60
3.2.2.	Freie und immobilisierte <i>Th. rugosum</i> -Zellen im Produktionsmedium	68
3.2.3.	Aufnahme und Einbau von markiertem Tyrosin durch freie oder immobilisierte <i>Th. rugosum</i> -Zellen	70

3.2.4.	Permeabilisierung von Th. rugosum-Zellen	75
3.2.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse mit Th. rugosum-Zellen	86
3.3.	Chenopodium rubrum	88
3.3.1.	Bestimmung der Betacyane aus Ch. rubrum	88
3.3.2.	Permeabilisierung von Ch. rubrum-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO und 1-Propanol	89
3.3.3.	Permeabilisierung von immobilisierten Ch. rubrum-Zellen	90
3.3.4.	Wachstums- und Produktionskinetik von permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen	92
3.3.5.	Wachstums- und Produktionskinetik von immobilisierten und permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen	97
3.3.6.	Untersuchungen zur Regenerierbarkeit von permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen	99
3.3.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse mit Ch. rubrum-Zellen	101
3.4.	Differenzierte Zellen	103
3.4.1.	Präparation der Mesophyllzellen	103
3.4.2.	Biosyntheseleistung der Blätter und Mesophyllzellen	105
3.4.4.	Einschätzung der Anwendungsmöglichkeit von differenzierten Zellen	112
4.	<u>Diskussion</u>	113
4.1.	Immobilisierung einer Kultur zur Steigerung des Sekundärstoffwechsels	113
4.2.	Permeabilisierbarkeit von pflanzlichen Zellkulturen	115
4.3.	Ausichtsreiche Anwendungsmöglichkeiten der Immobilisierungs- Permeabilisierungsmethoden	118
4.4.	Problematik bei der Nutzung von differenzierten Zellen	119

5.	Zusammenfassung	121
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	124

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
EtAc	Ethylacetat
FM	Frischmasse
GBF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung
GC	Gaschromatograph
GC-MS	Gaschromatograph + Massenspektrometer
HEPES	(N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethanol-sulfonische-Säure)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IM I/II	Produktionsmedien
MES	Medium für Mesophyllzellen
MSTFA	N-Methyl-N-trimethyl-trifluoracetamid
MX-Medium	Wachstumsmedium
NAA	Naphthylessigsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
t	Zeit
TBA	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TM	Trockenmasse
Upm	Umdrehungen pro Minute
V _L	Flußrate

1. Einleitung

1.1. Naturstoffproduktion mit pflanzlichen Zellkulturen

Naturstoffe aus Pflanzen sind auch heute noch wirtschaftlich bedeutsam. Sie werden für Lebensmittel, Kosmetika und Medikamente benötigt. Ungefähr 25% aller Wirkstoffe in der pharmazeutischen Industrie sind pflanzlicher Herkunft, wie z.B. Steroide, Codein, Reserpin, Atropin oder Chinin. Diese Substanzen sind strukturell häufig so komplex, daß ihre chemische Synthese nicht möglich ist oder unwirtschaftlich wäre. Deshalb werden alle wichtigen pflanzlichen Naturstoffe aus landwirtschaftlich angebauten Pflanzen gewonnen. Einige wichtige Arzneipflanzen können nur in bestimmten klimatischen Zonen angebaut werden, die oft weit entfernt von den eigentlichen Produktionsstätten liegen. Außerdem hängt die Verfügbarkeit der produzierenden Pflanzen von etlichen äußeren Faktoren ab, die schwer auszuschalten sind oder vorhergesehen werden können. So haben Wetterstürze, Pflanzenkrankheiten, Schädlingsbefall oder auch politische und wirtschaftliche Veränderungen im Erzeugerland in der Vergangenheit des öfteren zu beträchtlichen Produktionsschwankungen und Engpässen einzelner Pflanzenprodukte am Weltmarkt geführt.

Um solchen Unwägbarkeiten aus dem Wege zu gehen, wird die Möglichkeit der Produktion von Naturstoffen über pflanzliche Zellkulturen diskutiert (Zenk 1978, Barz und Ellis 1981, Shargool 1982, Fowler 1984, Misawa 1985). Da in jeder pflanzlichen Zelle die gesamte genetische Information der Pflanze vorhanden ist, was durch Regeneration von intakten Pflanzen aus Protoplasten morphologisch differenzierter Pflanzenteile belegt wurde (Davey 1983, Gupta 1986), ist zumindest theoretisch jede Zelle befähigt, alle ihr genetisch möglichen Syntheseleistungen ablaufen zu lassen. Es ist heute auch möglich, von den meisten Pflanzen Zellkulturen zu etablieren. Deshalb sollte jede gewünschte Naturstoffsynthese prinzipiell in geeigneten Zellkulturen durchgeführt werden kön-

nen. Zwar sind in den letzten 10 Jahren insgesamt beachtliche Fortschritte in der Optimierung der Naturstoffproduktion in pflanzlichen Zellkulturen gemacht worden, aber ein Durchbruch wurde noch nicht erzielt. Nur wenige Kulturen wiesen spontan bereits recht hohe Gehalte der gesuchten Inhaltsstoffe auf. Die Gehalte spontaner Hochproduzenten ließen sich dann relativ leicht weiter optimieren. Kulturen von Morinda citrifolia wiesen einen Anthrachinongehalt bis zu 18% der Trockenmasse auf (Zenk et al. 1975). Coleus blumei-Zellkulturen produzieren Rosmarinsäure bis zu 15% der Trockenmasse (Razzaque und Ellis 1979, Zenk et al. 1977a), Coptis japonica-Suspensionen akkumulieren Berberin bis 13% der Trockenmasse (Sato und Yamada 1984) und der Shikoningehalt von Lithospermum erythrorhizon wurde auf ca. 23% der Trockenmasse gesteigert (Tabata et al. 1974, Fujita et al. 1981a,b, 1982 und 1984). Mit der letztgenannten Kultur wird auch der erste und bisher einzige biotechnologische Prozeß zur Produktion eines Naturstoffes durch pflanzliche Zellkulturen durchgeführt.

Die Kulturen der pharmazeutisch wichtigsten Pflanzen enthielten jedoch nur geringe oder gar keine Mengen an wirksamen Substanzen (Berlin 1986). So werden Morphinalkaloide aus Papaver somniferum in geringen Mengen nur in morphologisch differenzierten Kulturen gefunden (Furuya et al. 1972, Ikuta et al. 1974, Tam et al. 1980). Das gleiche gilt für die wichtigen Tropanalkaloide Hyoscyamin und Scopolamin (Yamada und Hashimoto 1982).

Außer zur de-novo Synthese von Wirkstoffen können pflanzliche Zellkulturen auch zur Biotransformation von verfügbaren Vorstufen zu höherwertigen oder benötigten Produkten genutzt werden. Die 12ß-Hydroxylierung mit Digitalis lanata (Weiler 1977, Alfermann et al. 1977), die 5ß-Hydroxylierung durch Daucus carota (Jones et al. 1978, Veliky et al. 1980, Jones und Veliky 1981) oder die Synthese von Ajmalicin aus Tryptamin und Secologanin mit Catharanthus roseus (Stöckigt et al. 1976 und 1977, Krueger und Carew 1978) seien hier als Beispiele genannt.

Die Tatsache, daß der Sekundärstoffwechsel, dem die gesuchten Inhaltsstoffe entstammen, in Zellkulturen oft nicht oder nicht

stark expremiert ist, obwohl die Zellen potentiell dazu in der Lage sind, bedeutet, daß diese Syntheseleistungen in der Zelle einer strikten Regulation unterliegen (Luckner 1982). Um mehr und höhere Produktion sekundärer Naturstoffe zu erreichen, muß in diese Regulation eingegriffen werden. Zur Steigerung des Sekundärstoffwechsels bei pflanzlichen Zellkulturen wurden verschiedene Strategien erprobt, wie z.B. die Optimierung der Kulturmedien und die Selektion hochproduzierender Zelllinien. Mit der Medienoptimierung konnten nur die Gehalte bei spontan gut produzierenden Zellkulturen in biotechnologisch relevantem Ausmaß gesteigert werden (Fujita et al. 1982 und 1984, De-Eknamkul und Ellis 1984 und 1985, Zenk 1975). Zelllinien, die auf Grund umfangreicher Analysen der Gehalte einer größeren Zahl von Zellpopulationen selektioniert wurden, erwiesen sich als recht instabil in bezug auf die anfänglich hohe Syntheseleistung (Deus und Zenk 1982, Deus-Neumann und Zenk 1984, Berlin und Sasse 1985).

Da die bisherigen Methoden zur Produktoptimierung nicht die gewünschten Erfolge gebracht haben, werden neue Wege der Induktion und Steigerung sekundärer Stoffwechselwege diskutiert. Neben der Suche nach biogen und abiogenen Elizitoren (DiCosmo und Misawa 1985) und dem Versuch einer genetischen Manipulation (Berlin et al. 1985) wird die Immobilisierung pflanzlicher Zellen als aussichtsreiche Methode diskutiert (Rosevear und Lambe 1985). Die Begründungen für die Immobilisierung ergeben sich aus dem engen Zusammenhang zwischen der Expression des Sekundärstoffwechsels und dem Differenzierungsgrad der Zellen (Kutchan et al. 1983, Schuchmann und Wellmann 1983, Yoshikawa und Furuya 1982, Hashimoto und Yamada 1983). Durch die Immobilisierung pflanzlicher Zellkulturen könnte die Interaktion der Zellen vergrößert werden, und das könnte zu einer Änderung der Stoffwechselregulation führen, z.B. zu einer gesteigerten Sekundärstoffsynthese (Lindsey und Yeoman 1983). Daß sich die Immobilisierung positiv auf die Regulation des Sekundärstoffwechsels auswirken kann, darauf deuten die erhöhten Gehalte an Inhaltsstoffen bei Kulturen hin, die im Flüssigmedium in größeren Aggregaten wachsen (Lindsey und Yeoman 1983). Dabei wird angenommen, daß die Wechselwirkung zwischen benachbarten Zellen und die Ausbildung eines Konzentra-

tionsgradienten zwischen äußeren und inneren Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Expression des Sekundärstoffwechsels bilden (Rhodes und Kirsop 1982). Mit der Immobilisierung kann man diese Bedingungen für die Zellkultur schaffen. Ein weiterer Grund, warum die Immobilisierung pflanzlicher Zellen vorteilhaft sein könnte, ergibt sich aus der Empfindlichkeit pflanzlicher Zellen gegenüber Scherkräften bei der Fermentation (Shuler et al. 1983). Im immobilisierten Zustand wären die Zellen vor diesem Scherstreß besser geschützt.

1.2. Immobilisierung pflanzlicher Zellkulturen

Die Technik der Immobilisierung wird für mikrobielle Enzyme und Mikroorganismen bereits erfolgreich angewandt. Eine Auflistung der immobilisierten Enzyme haben z.B. Buke und Wisemann (1981) zusammengestellt. Als Beispiele der industriellen Anwendung immobilisierter Enzyme sei hier die Hydrolyse von Lactose (Charles 1973) und die Isomerisierung von Glucose genannt (Lee 1974). Mit immobilisierten Zellen werden z.B. Aminosäuren produziert (Chibata 1978 und 1980).

Aufbauend auf den Erfahrungen, die bei Mikroorganismen gemacht wurden, wurde auch mit der Immobilisierung pflanzlicher Zellkulturen experimentiert. Einen Überblick über dieses relativ junge Gebiet geben Übersichten von Brodelius und Mosbach (1982a), Rosevear und Lambe (1983 und 1985), Rhodes (1985) und Brodelius (1985).

Es wurden mehrere Methoden zur Immobilisierung pflanzlichen Zellkulturen untersucht und verglichen, von denen die Immobilisierung in Alginat zu den besten Ergebnissen führte (Brodelius und Nilsson 1980, Brodelius und Mosbach 1982a). Diese positiven Ergebnisse, zusammen mit der einfachen und schonenden Durchführung der Technik, sind der Grund dafür, daß die Immobilisierung in Alginat die verbreitetste Methode bei pflanzlichen Zellkulturen ist.

An immobilisierten pflanzlichen Zellkulturen wurde folgendes beobachtet:

1. Die Syntheseleistung konnte mit immobilisierten Zellen stabilisiert werden, d.h. sie hatten z.B. eine größere Toleranz gegenüber der Inkubationstemperatur und dem pH-Wert (Jones und Veliky 1981a), und Biotransformationsleistungen konnten erheblich länger aufrechterhalten werden (Brodelius et al. 1979, Alfermann et al. 1980).
2. Die Sekundärstoffbildung war bei immobilisierten Zellkulturen zum Teil stark erhöht, wie z.B. bei M. citrifolia (Brodelius et al. 1979, Brodelius und Mosbach 1982a), C. roseus (Brodelius und Nilsson 1980, Brodelius und Mosbach 1982a) und Capsicum frutescens (Lindsey und Yeoman 1984, Lindsey 1985).
3. Bei Zellen von Mucuna puriens, die in Alginat eingebettet waren, lag das Transformationsprodukt L-DOPA zu 90% im Medium vor, während es von freien Zellen zu 90% gespeichert wurde (Wichers et al. 1983). Hier wurde also durch die Immobilisierung der Zellen erreicht, daß das Biotransformationsprodukt in das Medium abgegeben wurde.

Mit diesen hier aufgezählten Eigenschaften schafft die Immobilisierung bessere Voraussetzungen zur biotechnologischen Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellkulturen.

1.3. Permeabilisierung pflanzlicher Zellkulturen

Die Naturstoffe wurden allerdings in der überwiegenden Zahl der Fälle auch von immobilisierten Zellkulturen in den Zellen gespeichert (Brodelius et al. 1979, Brodelius und Nilsson 1980). Die Abgabe dieser Verbindungen in das Medium wäre ein großer Vorteil für die Anwendung immobilisierter pflanzlicher Zellkulturen, da die Produkte meist leichter aus dem Medium zu gewinnen sind und das Zellmaterial für weitere Syntheseleistungen zur Verfügung stünde. Mit der Immobilisierung der Kultur allein wurde dies nur in dem oben erwähnten Einzelfall erreicht (Wichers et al. 1983). Die Permeabilisierung von pflanzlichen Zellen bietet die Möglichkeit, Verbindungen aus den Zellen herauszubringen. Wichtig ist natürlich, daß durch die Permeabilisierung die Vitalität der Zellen nicht zu stark herabgesetzt wird. In dieser Hinsicht verspricht die Permeabilisierung von immobilisierten Zellen eher

erfolgreich zu sein, da die Zellen besser gegen mechanische und osmotische Einwirkungen geschützt sind. So fanden Linsefors und Brodelius (1985), daß immobilisierte Protoplasten von C. roseus und D. carota länger lebensfähig und unempfindlicher waren als freie Protoplasten.

In einem Übersichtsartikel hat Felix (1982) die gängigsten Methoden der Permeabilisierung von Zellen zusammengestellt. Als geeignete Agentien zur Permeabilisierung pflanzlicher Zellkulturen haben sich besonders das Dimethylsulfoxid (DMSO) und das Chloroform erwiesen. Nachdem Zellen von C. roseus, die in Agarose immobilisiert worden waren, durch DMSO permeabilisiert wurden, blieben Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels über mehrere Tage aktiv (Felix et al. 1981, Felix und Mosbach 1982) und 85-95% der von den Zellen gebildete Ajmalicinmenge lag im Medium vor (Brodelius und Nilsson 1983).

1.4. Problemstellung

In der gesamten Literatur über die Immobilisierung von pflanzlichen Zellkulturen wurden bis zum Beginn der achtziger Jahre, als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, nur positive Beispiele gebracht. Die immobilisierten Kulturen hatten im Vergleich zu den freien Zellen eine erhöhte Sekundärstoffbildung, und ihre Synthese konnte über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Die Immobilisierung wurde als die Lösung propagiert, mit der die Expression des Sekundärstoffwechsels bei pflanzlichen Zellkulturen gesteigert werden konnte und die zu einer wirtschaftlichen Nutzung des Systems führen könnte. Ein weiterer Aspekt war, daß die Immobilisierung der Zellen die Abgabe der Produkte an das Medium erleichtern könnte.

An einem Beispiel wurde jedoch besonders deutlich, daß die publizierten Ergebnisse nur in dem Rahmen der gewählten Versuchsbedingungen gesehen werden durften. So wurde von Brodelius und Mosbach (1982a) eine 10fache Steigerung der Anthrachinongehalte mit immobilisierten M. citrifolia-Zellen erzielt. Von Zenk und Mitarbeitern war aber bereits 1975 ein Anthrachinongehalt bei

freien M. citrifolia-Zellen von 18% der Trockenmasse erreicht worden. Beide Ergebnisse passen so nicht zusammen.

Deshalb sollte in dieser Arbeit versucht werden, herauszufinden, ob die Immobilisierung pflanzlicher Zellen wirklich und generell diese biotechnologisch wichtigen Vorteile zur Naturstoffproduktion durch Zellkulturen bringt. Hierzu sollten Kulturen als Untersuchungsobjekte ausgesucht werden, die sich durch unterschiedliches Kulturverhalten und durch Inhaltsstoffe aus verschiedenen Stoffklassen unterscheiden. Diese Kulturen wurden in Alginat immobilisiert, da sich dies als universell geeignete Methode erwiesen hatte. Bei den Versuchen sollte die Syntheseleistung der immobilisierten Zellen direkt mit denen der freien Zellen unter den gleichen Bedingungen verglichen werden. Vor allem sollte durch Tracerexperimente geklärt werden, wie lange die Syntheseleistungen erhalten bleiben.

Es ist evident, daß immobilisierte pflanzliche Zellen nur dann von Vorteil sind, wenn das gewünschte Produkt mindestens in vergleichbar hohen Mengen wie von freien Zellen gebildet wird, und das Produkt ins Medium ausgeschieden wird. Akkumulation von Naturstoffen in den immobilisierten Zellen wäre biotechnologisch nur tolerabel, wenn die Syntheseleistung um ein Mehrfaches erhöht wäre oder gar erst durch die Immobilisierung induziert würde. Da aus der Literatur zu schließen war, daß die sekundären Inhaltsstoffe auch in den immobilisierten Zellen akkumulierten, sollte getestet werden, ob sich geeignete Methoden der Permeabilisierung pflanzlicher Zellen finden lassen. Insgesamt war es das Ziel dieser Arbeit, einen Beitrag zu der Frage zu liefern, ob die Immobilisierung einen Vorteil bei der Produktion von Naturstoffen durch pflanzliche Zellkulturen bedeuten kann und sie so einer industriellen Anwendung näherbringt.

Aus der Literatur konnte man entnehmen, daß durch die Immobilisierung die synthetischen Eigenschaften der Zellen länger aufrechterhalten werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit als weitere Möglichkeit zur Produktion von Naturstoffen die Immobilisierung von differenzierten Zellen untersucht werden, in denen der ge-

wünschte Stoffwechselweg schon expremiert ist. Mittels der Immobilisierung könnte es vielleicht möglich sein, diese Syntheseleistung der differenzierten Zellen zu nutzen. Es müßte nicht mehr die Expression induziert werden, sondern die bereits vorhandene Syntheseleistung der Zelle müßte stabilisiert werden. Allerdings ist für diese Untersuchungen steriles Pflanzenmaterial nötig. Es stellt sich die Frage, ob ausreichendes Material für solche Experimente zu erhalten ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturen

Nicotiana tabacum, L.c.v. Xanthi; mit dem Wildtyp TX1 und der p-Fluorphenylalanin-resistenten Zelllinie TX4. Beide Linien sind recht ausführlich charakterisiert worden (Berlin 1981; Berlin et al. 1982a; Berlin und Widholm 1978a,b; Berlin und Witte 1982; Palmer und Widholm 1975).

Thalictrum rugosum: Diese Zellkultur wurde vor kurzem in der Abteilung Pflanzliche Zellkulturen der GBF angelegt. Die Alkaloide wurden von der Abteilung Naturstoffchemie identifiziert (Forche und Kohl, unveröffentlicht).

Chenopodium rubrum: Diese Kultur wurde von Harms et al. (1977) angelegt und wird seit einigen Jahren in der Abteilung Pflanzliche Zellkulturen der GBF bearbeitet. Dabei wurde die Betalainproduktion der Kultur eingehend untersucht (Sieg 1983; Berlin et al. 1986).

2.1.2. Medien und Lösungen

Es wurden folgende Medien, falls nicht anders angegeben, benutzt:

MX-Medium: Hierbei handelt es sich um ein Wachstumsmedium nach Murashige und Skoog (1962) mit 2×10^{-6} M 2,4-D als Auxinzusatz.

IM I-Medium: Es ist ein Produktionsmedium, das auf der Basis des MX-Mediums von Knobloch und Berlin (1981a) für N. tabacum mit folgenden Änderungen entwickelt wurde:

- 8% Saccharose
- Phosphat
- Nitrat
- + 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{H-Citrat}$
- pH=6.0

IM II-Medium: Ein weiteres Produktionsmedium, das ebenfalls auf der Basis des MX-Mediums von Knobloch und Berlin (1981b) für Catharanthus roseus mit den folgenden Änderungen entwickelt wurde:

Konzentration der Salze im Medium (mg/l)

NH_4NO_3	160
KNO_3	610
KH_2PO_4	93
8% Saccharose	

Die beiden Produktionsmedien enthielten keine Phytohormone.

Präplasmolytikum A: 4% D-Sorbit

- 1% Dextransulfat 500 Na-Salz
- 5% Salzlösung

Präplasmolytikum B: 9% D-Sorbit

- 1% Dextransulfat 500 Na-Salz
- 5% Salzlösung

Macerations-Medium: 14.5% D-Sorbit

- 1% Dextransulfat 500 Na-Salz
- 1% Macerozym R 10
- 5% Salzlösung
- pH=5.8

Waschmedium: 14% D-Sorbit
5% Salzlösung

Inkubationsmedium (MES): 14% D-Sorbit
1.19% HEPES
5% Salzlösung
100 ug/100 ml 2,4-D
100 ug/100 ml 6-Benzylaminopurin
pH=7.0 mit KOH vor dem Autoklavieren

Salzlösung 20.0 mM KNO_3
4.0 mM KH_2PO_4
2.0 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
20.0 uM KJ
0.2 uM CuSO_4

MCW-Gemisch: Die N. tabacum-Zellen wurden mit einem Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch im Verhältnis 12/5/3 (v/v) extrahiert.

2.2 Methoden

2.2.1. Stammhaltung

Nicotianan tabacum: Aus einer 10 Tage alten Kultur wurden 7 ml in 70 ml MX-Medium (200-ml-Erlenmeyerkolben) überführt, das entspricht einer Frischmasse von 1.0 g. Die Kolben wurden mit Aluminiumkappen verschlossen und bei 27° C auf einem Horizontalrundschüttler mit 110 Upm im Dunkeln inkubiert.

Thalictrum rugosum: Mit einer Fritte wurden 12-14 Tage alte Zellen abgesaugt und 9.0 g Frischmasse wurden in 70 ml MX-Medium gegeben. Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert.

Chenopodium rubrum: Mit einem Schöpflöffel (ca. 2.0 g) wurden Zellen einer 14 Tage alten Kultur auf 70 ml MX-Medium überimpft. Die Kulturen wurden wie oben beschrieben kultiviert, allerdings unter permanentem Weißlicht.

2.2.2. Bestimmung der Wachstumsrate der Kulturen

Die Frischmasse einer Kultur wurde durch Absaugen eines Kolbens über eine Fritte mit Filterpapier mittels einer Wasserstrahlpumpe (ca. 2 Minuten) ermittelt. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte nach der Gefriertrocknung der Zellen.

2.2.3. Vitalitätsbestimmung

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Fluoresceindiaceetat-Test nach Widholm (1972) ermittelt. Vitale Zellen besitzen eine Acetylase, die Fluoresceindiaceetat in Fluorescein und Acetat spaltet. Bei kurzwelligem Licht (200-350 nm) fluoresziert das Fluorescein grünlich. Die Zellen wurden mit einer 0.01% igen Fluorescein-Lösung (in Aceton) behandelt und mikroskopisch untersucht.

2.2.4. Immobilisierung in Alginat

Die hier benutzte Methode entspricht hauptsächlich der von Jones und Veliky (1981). In eine 3% Alginsäurelösung wurden abgesaugte Zellen eingewogen und suspendiert, ca 20% Zellanteil (z.B. 20 g Zellen in 70 ml 3% Alginsäurelösung in einem 200-ml-Erlenmeyerkolben). Die Suspension aus Alginsäurelösung und Zellen wurde durch eine Pipette in die 50 mM

CaCl_2 -Lösung getropft (beim obigen Ansatz 500 ml in einem 1-l-Erlenmeyerkolben). Die CaCl_2 -Lösung wurde für 30 Minuten gerührt. Die Kugeln wurden mit einem Büchnertrichter abgetrennt und gespült. Um kleinere Kugeln zu erhalten wurde auch das Verfahren von Nilsson et al. (1983) angewandt. Die Suspension aus Alginsäurelösung und Zellen wurde in Soja-Öl getropft. Beim Rühren dieses Mehrphasensystemes bildet die Suspension Kugeln im Öl, deren Größe durch die Drehzahl der Rührung reguliert werden kann. Wenn die Suspension homogen in Kugeln dispergiert war, wurde die 50 mM CaCl_2 -Lösung hinzugegeben und das Ganze wurde 30 Minuten lang gerührt. Das Öl wurde abdekantiert und die Kugeln wurden wie oben beschrieben abgetrennt und gespült.

Aus 20 g Frischmasse an Zellen erhielt man rund 90 g Kugeln. Für einen Versuchsansatz mit 1.0 g Zellmasse wurden entsprechend 4.5 g Kugeln eingewogen.

2.2.5. Bestimmung der Zellmasse der immobilisierten Zellen

Die kovalente Bindung der Ca-Ionen mit den Carboxylgruppen der Alginsäure kann durch den Einsatz von Citrat, Phosphat oder DEAE (Komplexbildner) aufgehoben werden.

Die Kugeln wurden in einer 100 mM tri-Natrium-Citratlösung geschüttelt und die freien Zellen nach der Auflösung der Kugeln abgesaugt. Die weitere Bestimmung verlief wie bei 2.2.2.

2.2.6. Bestimmung der Cinnamoylputrescine

Mit einem Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch (12/5/3) und einem Turrax wurden die Tabakzellen extrahiert. Aus diesem Extrakt wurden die Cinnamoylputrescine mit Hilfe des Folin-Testes ermittelt (Knobloch und Berlin 1981). Mit dem Folin-Test werden auch andere phenolische Verbindungen erfaßt,

aber die Cinnamoylputrescine machen über 90% der Phenole im Zellextrakt von N. tabacum aus, und deshalb konnten sie über diesen Test quantifiziert werden (Knobloch und Berlin 1981).

Als eine weitere Methode zur Bestimmung der Cinnamoylputrescine wurde ein modifiziertes HPLC-System nach Ponchet et al. (1982) angewandt.

HPLC-System:

Hibar-Fertigsäule-EC-Li-Chrosorb RP-18 7 µm, 250-4 mm
Vorsäule " RP- 2 20 µm, 30-4 mm

V_L = 2 ml/min; Detektion bei 280 nm

Laufmittel: 95% H₂O (1% Eisessig und 1% TBA)/ 5% MeOH (v/v)

Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichkurve der Peakhöhen.

2.2.7. Bestimmung der Phenylalaninderivate über Dünnschichtchromatographie

Die aus den Fütterungsversuchen entstandenen Verbindungen in den Extrakten und Medienproben von N. tabacum-Zellen, wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und markierte Verbindungen wurden mit einem Berthold-TLC-Linear-Analyzer lokalisiert und quantifiziert. Die Proben wurden auf DC-Fertigplatten (Kieselgel 60) von Merck (0.25 mm; 20x20 cm) aufgetragen und in den nachfolgenden Laufmittelsystemen entwickelt:

- I Ethylacetat/Ethylmethylketon/Ameisensäure/Wasser-5/3/1/1
- II Butanol/Eisessig/Wasser-4/1/1
- III Ethylacetat/Ethylmethylketon/Eisessig/Wasser-5/3/1/1
- IV Benzol/Methanol/Eisessig-45/8/4
- V Dichlormethan/Heptan/2-Propanol-45/30/25; (jeweils v/v).

2.2.8. Bestimmung der Hauptalkaloide von Th. rugosum

Die Zellen wurden mit 70% MeOH im Wasserbad bei 70°C extrahiert. Aus Medienproben wurden die Alkaloide über mit MeOH aktivierte Octadecyl C₁₈-Säulen abgetrennt. Es wurden 5 ml Medium auf die Säule gegeben und mit destilliertem Wasser gespült. Die Alkaloide wurden mit 2 ml 80% H₂O (1% Ameisensäure und 0.7% Triethylamin)/20% Acetonitril (v/v), pH 3.7, eluiert.

Die Alkaloide aus den Zellextrakten und den Medienproben wurden über ein HPLC-System aufgetrennt und quantifiziert (Kohl unveröffentlicht).

HPLC-System:

Hyperchrome-SNC-Nucleosil-C₁₈-Säule 10 µm, 250-4 mm
 oder als präparative " -Säule 10 µm, 250-8 mm
 jeweils mit einer
 Hyperchrome-PC-Nucleosil-C₁₈ -Säule 10 µm, 30-4 mm

V_L = 2ml/min.; Detektion bei 300 nm.

Laufmittel A: 90% H₂O(1% Ameisensäure und
 0.7% Triethylamin)/10% Acetonitril pH 3.7
 B: 50% H₂O (1% Ameisensäure und
 0.7% Triethylamin)/50% Acetonitril pH 3.7

Die ersten 4 Minuten erfolgte der HPLC-Lauf isokratisch mit 20% Laufmittel B und 80% A. Anschließend wurde für 16 oder 8 Minuten ein linearer Gradient bis 100% des Laufmittels B gefahren. Die Quantifizierung erfolgte über Eichkurven der Peakhöhen.

2.2.9. Bestimmung der Betacyane von Ch. rubrum

Die Betacyane wurden mit 50% MeOH im Ultra-Turrax aus den Zellen extrahiert. Die Betacyangehalte aus dem Zellextrakt und dem Medium wurden photometrisch bestimmt. Die Betacyane haben im sichtbaren Bereich ihr Absorptionmaximum bei 538 nm (Sieg 1983).

2.2.10. Permeabilisierung

Die angegebenen Konzentrationen der Permeabilisierungsagentien wurden zu den Kulturen gegeben. Sollten sie nicht permanent in der Kulturflüssigkeit vorhanden sein, so wurden die Zellen nach der Permeabilisierungszeit (30 Minuten) mit einer Fritte sanft abgesaugt, zweimal mit frischem Medium gewaschen und für weitere Versuche verwendet.

2.2.11. Isolierung der Mesophyllzellen aus Blättern von Lupinus polyphyllus

Im Gewächshaus wurden Lupinus polyphyllus-Pflanzen unsteril angezogen. Von jungen Pflanzen wurden die Blätter für die Isolierung der Mesophyllzellen geerntet.

Oberflächensterilisation

Die Blätter, ungefähr 6 g, wurden mit destilliertem Wasser abgespült und für 1 Minute in 70% Ethanol (150 ml) gelegt. Danach wurden die Blätter mit sterilem destilliertem Wasser gespült und für 15 Minuten in einer 20%igen Hypochloritlösung (150 ml) mit 1-2 Tropfen Tween sterilisiert. Anschließend wurden die Blätter dreimal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen.

Mesophyllzellen-Präparation

In einer Petrischale wurde mit einer Pinzette die Mittelrippe und die untere Epidermis der Blätter entfernt. Mit einem Skalpell wurden die Blätter in Streifen geschnitten und im Präplasmolytikum A (50 ml) für 15 Minuten unter Vakuum infiltriert. Das Präplasmolytikum wurde abdekantiert und die Blattstücke wurden mit dem Präplasmolytikum B (50 ml) für weitere 15 Minuten bei 110 Upm geschüttelt. Die Lösung wurde wiederum abdekantiert und durch das Macerations-Medium (50 ml) ersetzt. Für 1 Stunde wurde die Blattstücke in dieser Lösung sanft geschüttelt. Mit einem Nylonnetz (200 μ m) wurden die Blattstücke abgetrennt und die Mesophyllzellen wurden mit einer Sigma-Zentrifuge bei 2000 Upm für 2 Minuten aus der Lösung abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, und die Mesophyllzellen wurden mit dem Waschmedium gespült.

Zur Immobilisierung wurden die Mesophyllzellen in einer geringen Menge MES-Medium (1-2 ml) aufgenommen und in 10 ml einer 3% Alginatlösung suspendiert. Die Immobilisierung wurde dann, wie unter 2.2.4 beschrieben, durchgeführt.

2.2.12.GC-MS Messungen

Isolierte Verbindungen aus Banden von DC-Chromatogrammen oder Zellextrakten wurden mit N-Methyl-N-trimethyltrifluoracetamid (MSTFA) silyliert, oder mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) trifluoracetyliert. Die Alkaloide aus L. polyphyllus wurden ebenfalls silyliert. Dazu wurden 100 μ g trockene Probe mit 100 μ l TFAA bzw. MSTFA für 30 Minuten bei 70°C erhitzt.

Der gaschromatographische Nachweis erfolgte über eine 15 m x 0.23 mm Quarzkapillarsäule mit einer chemisch gebundenen Methylsilikonphase (J+W Scientific) in einem Perkin-Elmer

Gaschromatographen F22, der direkt mit einem Massenspektrometer (AEI/MS30) gekoppelt war. Die Bedingungen waren: Injektortemperatur 250°C , Detektortemperatur 320°C ; der Ofen wurde mit einem Temperaturprogramm von $100\text{--}300^{\circ}\text{C}$ bei 6°C/Minute betrieben. Das Trägergas war Helium mit einem Vordruck von 0.75 bar.

2.2.13. In-vivo-NMR-Untersuchungen von permeabilisierten und unbehandelten *Catharanthus roseus*-Zellen

Dieser Versuch wurde erst nach Beendigung der experimentellen Arbeit durchgeführt, da die gerade neu erschienene Publikation von Lundberg und Mitarbeitern (1986) zumindest für *Catharanthus roseus*-Zellen scheinbar doch die schonende und erfolgreiche Permeabilisation möglich erscheinen ließ. Das sollte an einer mir zur Verfügung stehenden *C. roseus*-Kultur überprüft werden.

Zur Ermittlung des Permeabilisierungsgrades von mit DMSO behandelten *C. roseus*-Zellen, wurde der Ausfluß von Phosphat aus der Vakuole durch in-vivo- ^{31}P -NMR-Spektroskopie, wie bei Lundberg und Mitarbeitern (1986) beschrieben, verfolgt.

Hierzu wurden *C. roseus*-Zellen (40 g Frischmasse) aus der Stammhaltung auf frisches MX-Medium (160 ml) mit 2.5 mM Orthophosphat (Pi) überimpft. Die Aufnahme des Phosphates erfolgt in relativ kurzer Zeit und es wird in der Vakuole gespeichert (Wray et al. 1983, Vogel und Brodelius 1984, Brodelius und Vogel 1984, 1985). Nach 5 Stunden wurden die Zellen mit einer Fritte abgesaugt und mit 50 mM MOPS-Puffer, pH 6.5 mit 40 mM KCl, 20 mM CaCl_2 , 15 mM Sucrose, 5 mM KNO_3 und 0.2 mM MgSO_4 (Puffer A) gewaschen. Proben von 2.0 g Frischmasse an Zellen wurden in 10 ml Puffer A mit 5% DMSO für 30 Minuten, 1 Stunde oder 2 Stunden permeabilisiert,

abgesaugt, gewaschen und in frischem Puffer A weiter inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden 1.0 g Zellen in 1.5 ml Puffer A, 0.5 ml D_2O und etwas Antischaumreagenz (Polyethylenglycol, 15 μ l) in einem NMR-Röhrchen suspendiert.

Die Veränderungen des Phosphatpools in der Vakuole wurde mittels in-Vivo- ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt (Wray et al. 1983). Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WM 400 NMR-Spektrometer bei 162 MHz ohne 1H -Entkopplung, bezogen auf das Deuterium Signal von D_2O , aufgenommen. Es wurde eine Spektrenbreite von 5000 H_z mit 90° Pulsen und einer Puls-wiederholungsrate von 0.8 s erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Cinnamoylputrescine in *Nicotiana tabacum*

Einige Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* bilden spontan Cinnamoylputrescine (Mizusaki et al. 1971, Berlin et al. 1982, Flores et al. 1985). In der GBF werden entsprechende Zellkulturen seit einigen Jahren als Modellsysteme intensiv bearbeitet. Die Linie TX1, vor 25 Jahren etabliert (Filner 1965), akkumuliert zwischen 0.4-1.5% Cinnamoylputrescine (Abb. 1) bezogen auf die Trockenmasse (Berlin et al. 1982). Die Linie TX4, die sich von der TX1-Linie ableitet, wird ebenfalls schon über 10 Jahre in Kultur gehalten. Sie akkumuliert sogar 6-10% der Biomasse als Cinnamoylputrescine (Palmer und Widholm 1975, Berlin und Widholm 1977).

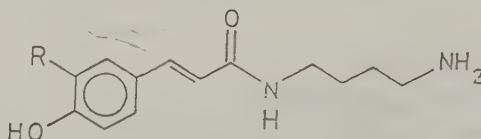


Abb. 1: Cinnamoylputrescine aus Tabakzellen TX1 und TX4: Caffeo-yl- (R=OH), Feruloyl- (R=OCH₃) und p-Coumaroyl- (R=H) putrescin.

Das Wachstums- und Produktionsverhalten der Kultur sowie die Beeinflußbarkeit ihrer Produktivität durch Medienvariation und Zugabe von Vorstufen sind genauestens untersucht (Knobloch und Berlin 1981, Berlin und Witte 1982). Deshalb war es sinnvoll, die Untersuchungen über die Immobilisierung pflanzlicher Zellen mit diesem gut charakterisierten System zu beginnen. Die Schwankungsbreite der Cinnamoylputrescingehalte (0.4-1.5% bzw. 6-10%), die man beobachtet hatte (Berlin et al. 1982), ließ es als notwendig erscheinen, den Vergleich freier und immobilisierter Zellen immer von einer Ausgangskultur vorzunehmen.

3.1.1. Immobilisierung von TX1-Zellen und Kultivierung im Wachstumsmedium

In einem ersten Versuch wurden TX1-Zellen in 3% Alginat immobilisiert (1.0 g Frischmasse an Zellen entsprachen 3.9 g Kugeln) und in 20 ml MX-Wachstumsmedium nach Murashige und Skoog (1962) inkubiert (Abb. 2a).

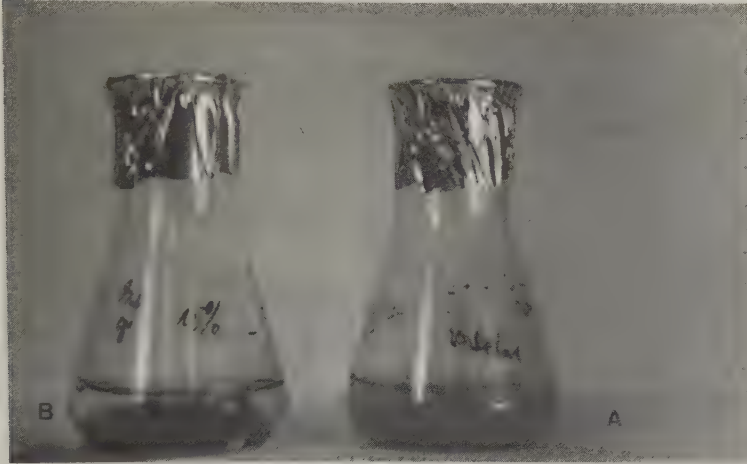


Abb.:2 Immobilisierte TX1-Zellen (1 g Zellen/3.9 g Kugeln in 20ml a) Wachstumsmedium und b) Produktionsmedium IM I). Die Trübung in a) ist auf das Auftreten freier Zellen zurückzuführen.

Schon nach einigen Tagen waren neben den Kugeln freie Zellen im Medium zu erkennen, deren Anzahl im Laufe der Kulturzeit rasch zunahm (Abb. 2a). Die Zellen waren nach der Immobilisierung nicht nur vital geblieben, sondern wuchsen aus den Kugeln heraus. Durch das starke Zellwachstum brachen nach längerer Kulturzeit einige Kugeln auseinander. Damit geht ein erwähnter Vorteil der Immobilisierung, die Langzeitnutzung, bei rasch wachsenden Kulturen verloren. Auch andere Autoren machten diese Erfahrung, und Morris und Fowler (1981) schlugen vor, dies als Möglichkeit zur Etablierung einer besonders fein suspendierten Kultur zu nutzen.

Immobilisierte Zellen schnellwachsender Kulturen müssen deshalb

unter Bedingungen kultiviert werden, die das Wachstum der Zellen reduzieren oder begrenzen (Abb. 2b). Das muß keinen Nachteil für die Produktion von Naturstoffen bedeuten, da unter solchen Bedingungen meist auch die Sekundärstoffbildung erhöht ist (Berlin et al. 1983; Fujita et al. 1981a,b; Kubek und Shuler 1980a,b; Zenk et al. 1977b). Darum wurden alle Versuche mit immobilisierten Zellen, die mehrere Tage dauerten, in einem Produktionsmedium (wachstums-limitiert) durchgeführt.

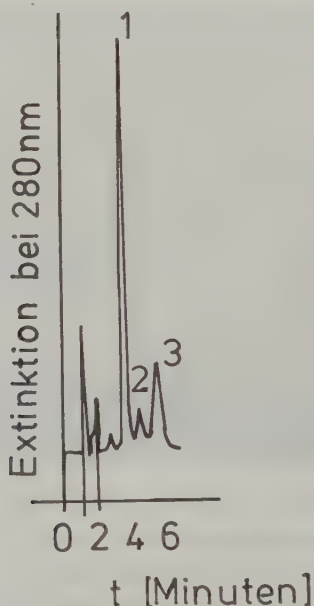


Abb. 3: HPLC-Trennung von Cinnamoylputrescinen aus TX1-Zellen:Hi-bar-Fertigsäule-EC-LiChrosorb RP-18, 7 μm ; Laufmittel 95% H_2O (1% Eisessig und 1% TBA)/5% MeOH (v/v) ; Detektion bei 280 nm. 1) Caffeoyl-, 2) p-Coumaroyl- und 3) Feruloylputrescin.

Die Kugeln sollten gleichmäßig mit Zellen beladen sein, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Außerdem müssen die Cinnamoylputrescine aus den immobilisierten Zellen zurückgewonnen werden können. Um dies zu überprüfen, wurden Kugeln mit immobilisierten TX1-Zellen sofort nach der Herstellung mit einer tri-Natriumphosphatlösung wieder aufgelöst und die so erhaltene Zellmasse verschiedener Ansätze verglichen. Zur Bestimmung der Zellmasse wurden

die Kugeln und freien Zellen gefriergetrocknet. Die Cinnamoylputrescine wurden aus den Proben mit einem Methanol/Chloroform/Wasser-Gemisch (MCW-12/5/3) am Ultraturrax extrahiert (Tab. 1). Die Cinnamoylputrescine wurden durch HPLC (Ponchet et al. 1982) (Abb. 3) oder mit dem Folin-Test (Knobloch und Berlin 1981) bestimmt. Beide Methoden erbrachten für die Zellextrakte die gleichen Ergebnisse. Die Zusammensetzung der Cinnamoylputrescine wich nur geringfügig von den früher angegebenen Verhältnissen ab (Berlin et al. 1982).

Tabelle 1: Ausbeute der Trockenmasse und der Cinnamoylputrescine aus 10 Tage alten TX1-Zellen (1.0 g Frischmasse) frei oder immobilisiert (sofort aufgearbeitet, jeweils 5 Parallelansätze).

	Trockenmasse		Cinnamoylputrescine	
	(mg)	(%)	(ug)	(%)
freie Zellen	52+4	100	62+4	100
immobilisierte Zellen	155+5	-	48+4	78
aufgelöste Kugeln	46+4	88	55+7	89

Die Standardabweichung bei den Ansätzen der freien Zellen und der aufgelösten Kugeln zeigt, daß die immobilisierten Zellen relativ gleichmäßig auf die Kugeln verteilt waren. Der Verlust an Zellmasse in den Kugeln von ca. 10% gegenüber dem errechneten Wert, geht auf die Rückstände der Alginsäure-Zellsuspension an den Glasgefäßen bei der Immobilisation zurück. Der Cinnamoylputrescingehalt freier Zellen wurde auf 100% gesetzt. Aus den Zellen aufgelöster Kugeln wurden 89% und aus den Kugeln selbst 78% der Cinnamoylputrescine extrahiert. Berücksichtigt man den geringeren Zelleinsatz von ca. 10% in den Kugeln, bleibt ein Extraktionsverlust von ungefähr 10%. Es fand vermutlich eine geringe Bindung der Cinnamoylputrescine an die Alginsäure statt.

3.1.2. Kinetik von TX1-Zellen im Wachstumsmedium

Als Ausgangsbasis für die weiteren Versuche wurde die Syntheseleistung der TX1-Linie überprüft (Abb. 4). Die Cinnamoylputrescin-Akkumulation und das Wachstumsverhalten der TX1-Zellen bewegten sich im Rahmen der bekannten Schwankungsbreite (Berlin et al. 1982). In der Abb. 4 sind die Mittelwerte dreier paralleler Ansätze mit ihrer maximalen Abweichung angegeben. Nur Steigerungen in der Produktion von Cinnamoylputrescinen, die deutlich größer sind als diese Variabilität, sollen als signifikant beim Vergleich von immobilisierten Zellen mit freien angesehen werden.

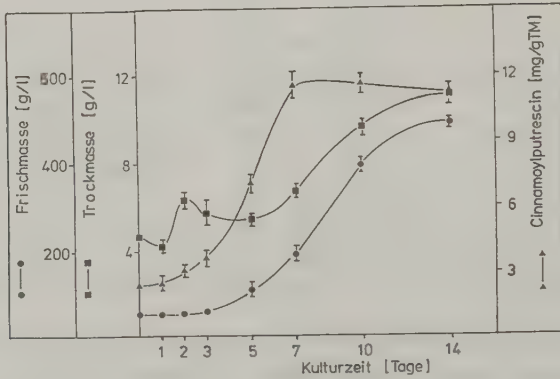


Abb. 4: Wachstums- und Produktionskinetik von TX1-Zellen; Animpfdichte: 1.0 g Frischmasse/20 ml MX-Medium in 50-ml-Kolben.

3.1.3. Cinnamoylputresceinbildung von freien und immobilisierten TX1-Zellen im Produktionsmedium

Im Produktionsmedium IM I konnten die spezifischen Cinnamoylputrescingehalte in TX1-Zellen bis zu 6fach gesteigert werden (Knob-

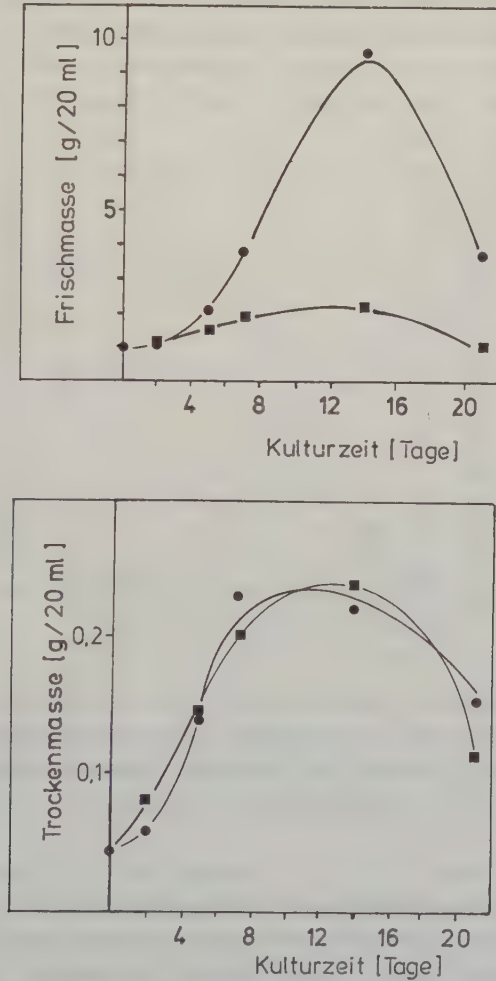


Abb. 5: Wachstumskinetik von 10 Tage alten freien TX1-Zellen: 1.0 g Frischmasse in 20 ml MX- ●—● oder IM I ■—■ Medium;

(a) Frisch- und (b) Trockenmasse.

loch und Berlin 1981). Dieses Medium, in dem das Wachstum der Zellen begrenzt war, sollte sich auch für die Kultivierung von immobilisierten TX1-Zellen eignen. Ein Vergleich mit freien Zellen sollte Aufschluß darüber geben, ob die Syntheseleistung bei immobilisierten TX1-Zellen gesteigert wird und/oder länger erhalten bleibt. Die Abbildung 5 zeigt die Entwicklung der Zellmasse von freien TX1-Zellen im IM I-Medium im Vergleich zum MX-Medium. Man erkennt deutlich, daß die Zunahme der Trockenmasse in IM I-Medium kein Wachstum darstellt, sondern durch die Einlagerung von Saccharose zustandekommt.

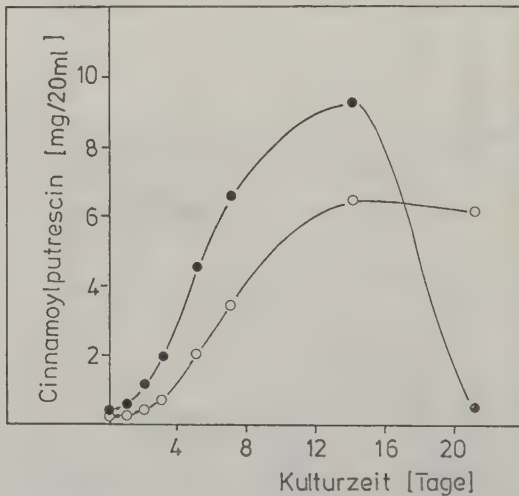


Abb. 6: Cinnamoylputrescingehalte (im MCW-Extrakt) der Zellen ●—● und der Kugeln ○—○. Es wurden 1.0 g Frischmasse an TX1-Zellen frei oder immobilisiert in 20 ml IM I-Medium inkubiert. Es sind die Mittelwerte aus drei parallelen Ansätzen angegeben.

Aus der Abbildung 6 ist zu ersehen, daß die Cinnamoylputrescine in den immobilisierten Zellen erhalten bleiben. Die Einbettung der Tabakzellen in die Matrix verlieh ihnen eine länger anhaltende Stabilität. Die freien Zellen verfärbten sich nach 14-16 Tagen dunkel. Durch Zelllyse ging ein Teil der Cinnamoylputrescine verloren. In den immobilisierten Zellen fand augenscheinlich

keine oder wenig Zelllyse statt. Die freien Zellen bildeten rund 9.5 mg Cinnamoylputrescine. Bezogen auf die Trockenmasse waren das annähernd 4%, was eine knappe Vervielfachung gegenüber den Gehalten im Wachstumsmedium bedeutet. Die immobilisierten Zellen bildeten in diesem Zeitraum 6.5 mg, d.h. in den TX1-Zellen wurde der Gehalt durch die Immobilisierung nicht gesteigert. Ob das an einer fehlenden Induktion gelegen hatte, sollte in einem der nachstehenden Versuche überprüft werden.

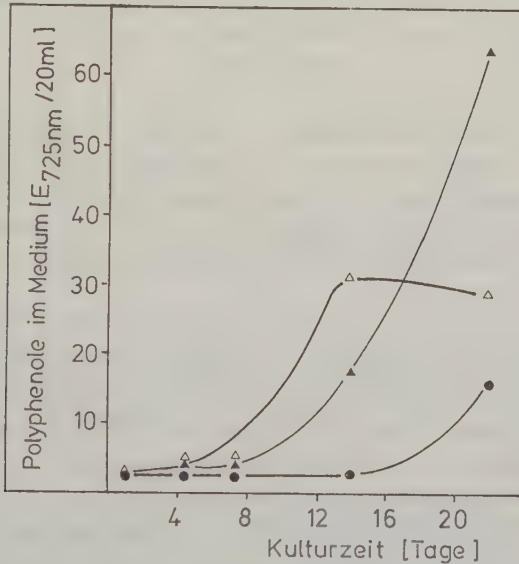


Abb. 7: Polyphenolgehalte im Medium von freien ▲—▲ und immobilisierten Δ—Δ TX1-Zellen im IM I-Medium und von freien ●—● Zellen im MX-Medium. Pro Ansatz wurden 1,0 g Zellen in 20 ml inkubiert. Der Polyphenolgehalt wurde mit dem Folin-Test ermittelt.

Durch Analysen der Polyphenolgehalte im Medium wurde untersucht, ob die immobilisierten Zellen vermehrt ihre Inhaltsstoffe an das Medium abgegeben hatten. Die Abbildung 7 zeigt erhöhte Polyphenolgehalte im Medium gegen Ende der Kulturzeit vor allem bei freien Zellen. Wahrscheinlich gelangten diese Verbindungen durch Zelllyse in das Medium. Auch die immobilisierten Zellen gaben

Cinnamoylputrescine ab, aber die Immobilisierung führte nicht dazu, daß Inhaltsstoffe spontan und vermehrt ausgeschieden wurden. Die Kugeln blieben während der Kulturzeit im IM I-Medium stabil, und ein Wachstum freier Zellen im Medium wurde nicht beobachtet.

Es wurde von immobilisierten Zellen im letzten Kulturabschnitt augenscheinlich keine weiteren Cinnamoylputrescine gebildet (Abb. 6). Deshalb sollte bei den nächsten Versuchen auch die Synthesefähigkeit von immobilisierten Zellen, besonders nach längerer Kulturzeit, durch Einbauversuche mit der Vorstufe L-Phenylalanin untersucht werden.

Die bisherigen Daten sprechen zwar für eine "Stabilisierung" der Cinnamoylputrescin-Akkumulation in immobilisierten Zellen, aber sie sind kein Beweis dafür, daß die immobilisierten Zellen länger Cinnamoylputrescine synthetisieren als freie. Im Gegenteil, nach Abb. 6 muß man davon ausgehen, daß die Synthese nach 12-14 Tagen zum Stillstand kommt.

Die Induktion der Cinnamoylputrescinbildung in TX1-Zellen erfolgt in den ersten 24-48 Stunden (Knobloch und Berlin 1981). Die geringere Produktivität der immobilisierten Zellen könnte durch die fehlende Induktion in den Kugeln erklärt werden. Deshalb wurde versucht, freie Zellen durch Vorinkubation im IM I-Medium zu induzieren und die aktivierten Zellen erst dann zu immobilisieren. In der Abb. 8 ist das Ergebnis eines solchen Versuches dargestellt. Bis zum 7. Kulturtag differierten die Ergebnisse der einzelnen Ansätze nicht sehr stark. Die 1 und 2 Tage lang vorinkubierten Zellen reagierten etwas schneller als die Kontrolle und die 3 Tage lang vorbehandelten Zellen. Alle vorbehandelten Zellen blieben jedoch hinter den Gehalten der sofort immobilisierten Zellen zurück, die die höchsten Ausbeuten an Cinnamoylputrescinen erzielten. Der Wechsel vom MX-Medium in das IM I-Medium ist für die Zellen zweifelsohne ein osmotischer Streß. Möglicherweise waren die Zellen nach einer solchen Behandlung noch nicht ausreichend in der Lage den nächsten Streß, die Immobilisierung, zu ertragen.

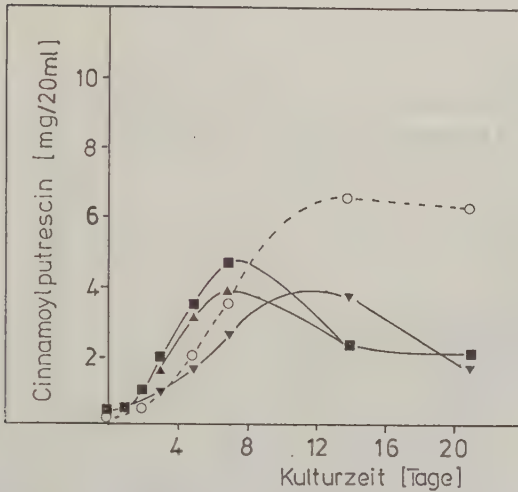


Abb.8: Cinnamoylputrescingehalt immobilisierter TX1-Zellen; ○—○ 1.0 g Frischmasse wurden direkt vom MX-Medium immobilisiert und in 20 ml IM I-Medium inkubiert, oder vor der Immobilisierung für 1 ■—■ , 2 ▲—▲ und 3 Tage ▼—▼ im IM I-Medium inkubiert.

3.1.4. Aufnahme von L-(U-¹⁴C)Phenylalanin durch Tabakzellen

Die Ergebnisse unter 3.1.3. lassen erkennen, daß auch die Tabakzellen durch die Immobilisierung stabilisiert wurden. Es fand jedoch zeitlich keine verlängerte Synthese der Cinnamoylputrescine statt. Wie lange der Syntheseweg der Cinnamoylputrescine in immobilisierten Zellen aktiv bleibt, wurde durch Fütterungsversuche mit Phenylalanin geklärt. Exogen gefüttertes Phenylalanin wird von TX1-Zellen, in relativ hohen Raten in die Cinnamoylputrescine eingebaut (Berlin und Witte 1982). Zusätzlich kann durch die markierten Aminosäuren auch einiges über den physiologischen Zustand der Zellen erfahren werden, da die Aminosäuren über einen aktiven Transport aufgenommen werden, der nur in vitalen Zellen stattfindet (Berlin und Widholm 1978b). Deshalb ist die Aufnahme-

fähigkeit der Zellen ein guter Indikator für ihre Vitalität.

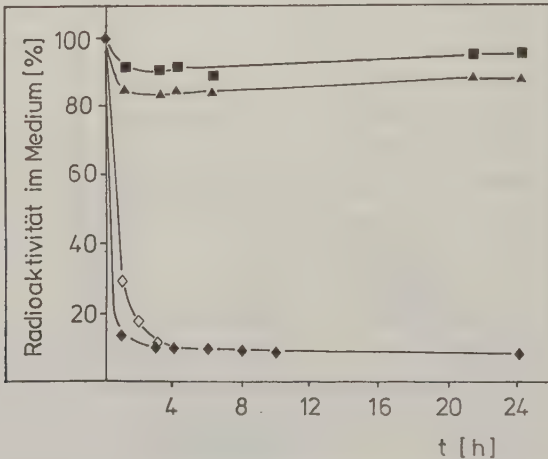


Abb. 9: Abnahme der Radioaktivität (0,5 uCi L-(U- 14 C-) Phenylalanin) aus dem Kulturmedium von 10 Tage alten freien ◆—◆ oder immobilisierten ◇—◇ TX1-Zellen (1g/Ansatz); als Kontrollen dienten Alginatkugeln ▲—▲ oder tote immobilisierte ■—■ Zellen.

In der Abbildung 9 ist die Aufnahme von markiertem Phenylalanin durch freie und immobilisierte Zellen dargestellt. Die immobilisierten Zellen nahmen das L-Phenylalanin etwas langsamer auf als die freien Zellen. Nach spätestens 6 Stunden änderte sich die Radioaktivitätsmenge im Medium nicht mehr. Eine geringe Bindung von ca. 15% an das Alginat wurde beobachtet. Bei den Ansätzen mit den toten immobilisierten Zellen waren rund 10% der Radioaktivität gebunden worden. Durch die Beladung war die freie Oberfläche des Alginats verringert und weniger aufnahmefähig.

Die Aufnahmekinetik wurde mehrmals wiederholt und zeigte nur geringfügige Schwankungen. Nach spätestens 6 Stunden waren immer 90% der angebotenen Radioaktivitätsmenge aufgenommen worden. Aus den freien und aus den immobilisierten vitalen Zellen konnten nach 24 Stunden ca. 24% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge

wieder extrahiert werden. Im Wachstumsmedium verhielten sich freie und immobilisierte Zellen hinsichtlich der Aufnahme-
geschwindigkeit und der Extrahierbarkeit der Radioaktivitätsmenge
gleich.

Die Aufnahme von markiertem Phenylalanin durch TX1-Zellen wurde
auch im Produktionsmedium untersucht. Die Zellen waren 24 Stunden
vor der Fütterung auf das IM I-Medium umgesetzt worden. Die Ta-
belle 2 gibt die Radioaktivitätsmenge im Medium von immobili-
sierten TX1-Zellen wieder. Aus 5 parallelen Ansätzen sind die
Mittelwerte und die Standardabweichung angegeben.

Nach 4 Stunden waren über 90% der angebotenen Radioaktivitäts-
menge aufgenommen worden. Aus den Kugeln wurden nach 24 Stunden
31% der Radioaktivitätsmenge extrahiert, und aus den freien Zel-
len waren es 28%.

Tab.2: Verlauf der Radioaktivität (%) im Medium; nach Gabe von
0,5uCi Phenylalanin an TX1-Zellen (1g/Ansatz), die in IM I-Medium
inkubiert waren.

Zeit (h)	Radioaktivität (%)
0.5	59.0+2.0
1.0	34.0+2.0
2.0	13.0+1.0
4.0	6.4+0.5
5.0	6.8+0.3
24.0	11.2+0.3

Die Zellextrakte wurden auf Kieselgelplatten im Laufmittelsystem
I getrennt und die Chromatogramme anschließend auf ihre Radioak-
tivitätsverteilung gescannt (Abb.10). Die Abbildung 10 zeigt, daß
neben dem nicht umgesetzten Phenylalanin (1) mit einem RF-Wert
von 0.54 hauptsächlich im Caffeoylputrescin (2) mit einem RF-Wert
von 0.31 markiert war. Geringe Mengen an radioaktiven Verbindun-
gen tauchten in einem weiteren Peak (3) auf. Freie und immobili-
sierte Zellen bauten das markierte Phenylalanin nicht nur in die

gleichen Verbindungen ein, sondern auch im gleichen Ausmaß. In der Tabelle 3 ist der prozentuale Einbau durch Integration der Peaks wiedergegeben.

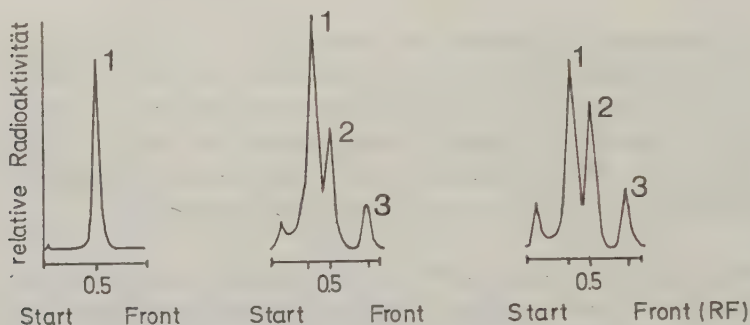


Abb. 10: Verteilung der Radioaktivität in Zellextrakten freier (b) und immobilisierter (c) TX1-Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit L-(U- ^{14}C)-Phenylalanin im IM I-Medium. Trennung auf Kieselgel im Laufmittelsystem I (a) Phenylalaninstandard; (1) Phenylalanin, (2) Caffeoylputrescin und (3) andere.

Tab.3: Radioaktivitätsverteilung (%) im Zellextrakt von freien und immobilisierten TX1-Zellen im IM I-Medium nach 24 stündiger Fütterung von L-Phenylalanin.

	^{14}C -Radioaktivität (%)	
	freie Zellen	immobilisierte Zellen
MCW-Extrakt	23	30
davon sind:		
Caffeoylputrescin	56	71
Phenylalanin	31	26

Die immobilisierten Zellen bauten die Radioaktivität stärker in das Caffeoylputrescin ein, der Hauptkomponente der Cinnamoylputrescine.

3.1.5. Aufnahme und Einbau von markiertem Phenylalanin zu unterschiedlichen Kulturzeiten

Die Aufnahme und die Umsetzung des zugefütterten Phenylalanins durch junge freie und immobilisierte Zellen war vergleichbar. Deshalb sollten Vergleiche während eines längeren Zeitraumes darüber Aufschluß geben, inwieweit sich die biosynthetische Leistung von freien und immobilisierten Zellen im Laufe der Zeit unterscheiden.

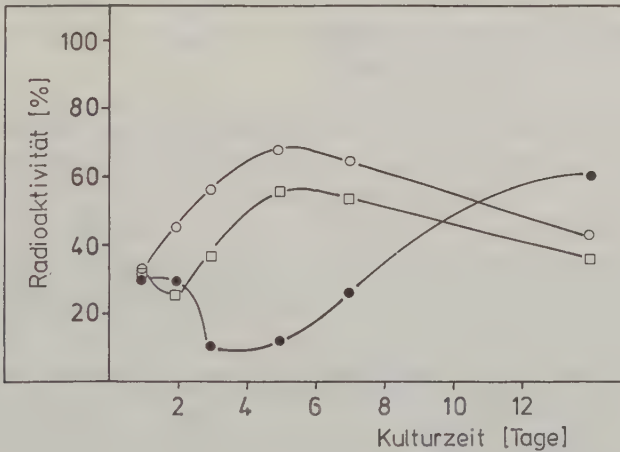


Abb. 11: Mit MCW extrahierbare Radioaktivitätsmenge (%) aus freien und immobilisierten TX1-Zellen zu verschiedenen Kulturzeiten mit 0.5 uCi L-(U-¹⁴C)Phenylalanin 24 Stunden vor der Ernte gefüttert; 1.0 g Zellen in 20 ml Medium: Freie ○—○ und immobilisierte □—□ Zellen im IM I-Medium und freie ●—● Zellen im MX-Medium.

Freie Zellen wurden im Wachstums- und Produktionsmedium inkubiert. Immobilisierte Zellen wurden nur im Produktionsmedium kultiviert. Jeder Ansatz wurde 24 Stunden vor der Ernte mit L-(U-¹⁴C)Phenylalanin (0.5 uCi) gefüttert. Innerhalb dieser 24 Stunden wurde bei allen Ansätzen ca. 90% des Phenylalanins aufgenommen.

Die Abbildung 11 zeigt die extrahierte Radioaktivitätsmenge (%) aus Zellen und Kugeln zu verschiedenen Kulturzeiten. Aus den freien Zellen war während der Wachstumsphase wenig Aktivität extrahierbar. Das markierte Phenylalanin wurde vermutlich in erster Linie ins Protein eingebaut. Erst nach Abschluß des Wachstums stieg die Radioaktivität in den Zellextrakten auf 60% an. Im Produktionsmedium waren bereits früher größere Aktivitätsmengen mit dem MCW-Gemisch extrahierbar. Hier ist das Wachstum unterdrückt, und das Phenylalanin kann verstärkt in die Sekundärmetabolite eingebaut werden. Nach dem 7. Tag nahm die Radioaktivitätsmenge in den Zellextrakten wieder ab. In der Tendenz verhielten sich die immobilisierten Zellen wie die freien. Daß ihre absoluten Werte etwas niedriger lagen, erklärt sich aus den leichten Extraktionsverlusten.

Wie bereits erwähnt wurde, unterscheidet sich die TX4-Linie von TX1-Zellen durch die stark erhöhte Cinnamoylputrescinebildung (Berlin et al. 1982). Dadurch kommt es auch in TX4-Zellen zu einem stärkeren Einbau von gefüttertem Phenylalanin in die Cinnamoylputrescine (Berlin 1981). TX4-Zellen sind deshalb für einen Langzeitversuch eher geeignet, da höhere Einbauraten zu erwarten sind.

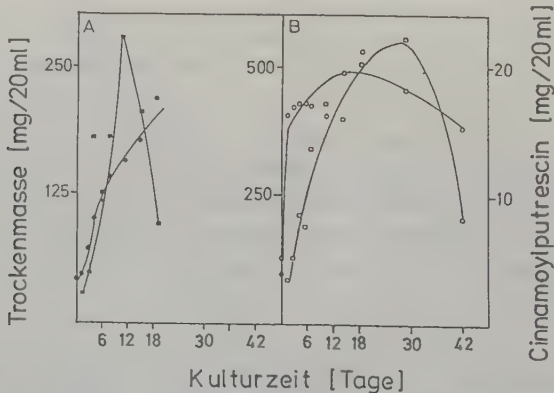


Abb. 12: Wachstumskinetik (A) und Cinnamoylputrescineproduktion (B) von freien □—□ und immobilisierten ○—○ TX4-Zellen

(1.0 g Frischmasse/20 ml IM I-Medium).

Es wurden 10 Tage alte TX4-Zellen als freie oder in Alginat immobilisierte Zellen angeimpft. In der Abbildung 12 ist die Cinnamoylputrescinbildung durch freie und immobilisierte Zellen wiedergegeben. Zusätzlich wurden die Proben 24 Stunden vor der Ernte mit 0.25 uCi L-(U-¹⁴C)Phenylalanin gefüttert. Der Einbau in die Cinnamoylputrescine sollte Aufschluß über die Synthesefähigkeit der Zellen geben, besonders gegen Ende der Kulturzeit.

Aus der Abbildung 12 geht hervor, daß die Cinnamoylputrescingehalte der freien Zellen nach dem 12. Kulturtag drastisch zurückgingen. Hingegen blieben sie bei den immobilisierten Zellen bis zu 30 Tage in den Kugeln erhalten. Die immobilisierten Zellen bildeten pro Ansatz ebensoviel Cinnamoylputrescine wie die freien Zellen. Der Anstieg der Gehalte ging etwas langsamer vonstatten. Ebenso wie die TX1-Zellen (Abb. 6) zeigt auch dieses Ergebnis, daß die Immobilisierung zur Stabilität der Zellen beiträgt. Nach 14 Tagen begannen die freien Zellen zu lysieren.

In der Abbildung 13 ist die aufgenommene und die in die Cinnamoylputrescine eingebaute Radioaktivitätsmenge dargestellt. Die Radioaktivitätsverteilung in den Cinnamoylputrescinen wurde durch Szintillationsmessung der entsprechenden Fraktionen der HPLC-Trennung ermittelt. Von der aufgenommenen extrahierbaren Radioaktivität wurde von den immobilisierten Zellen ein größerer Anteil in die Cinnamoylputrescine eingebaut (Abb. 13b). Nach 14 Tagen nahm aber auch in den immobilisierten Zellen die Neusynthese stark ab.

Die Fütterungsversuche zeigten, daß die freien Zellen nur bis zum 14. Tag in der Lage waren, das markierte Phenylalanin aufzunehmen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden von freien und immobilisierten Zellen jeweils 90% der angebotenen Radioaktivitätsmenge aus dem Medium aufgenommen. Nach dem 14. Tag ging die Aufnahme bei den immobilisierten Zellen auf 70-80% zurück.

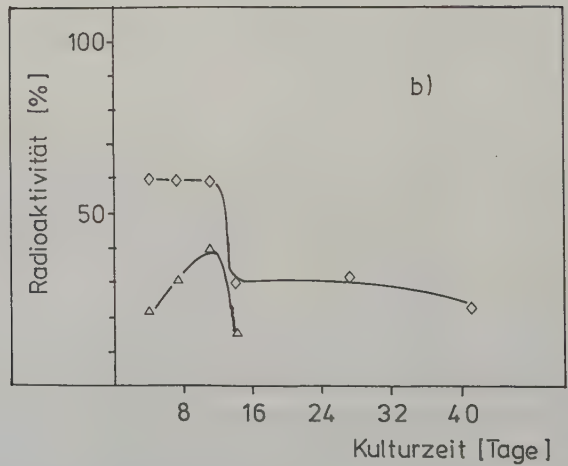
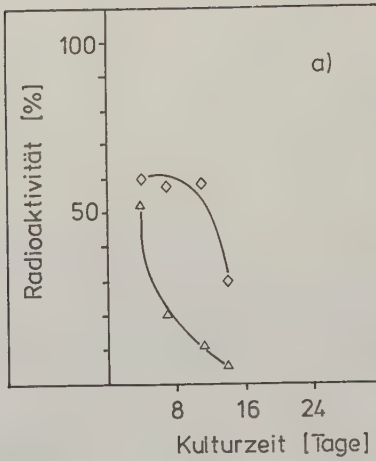


Abb.13: Radioaktivität a) im Zellextrakt und b) in den Cinnamoyl-putrescinen von freien Δ - Δ und immobilisierten $\diamond$ - $\diamond$ TX4-Zellen 1.0 g FM/20 ml IM I mit markiertem Phenylalanin gefüttert.

3.1.6. Bewertung der Immobilisierungsversuche

Die immobilisierten Tabakzellen waren ungefähr im gleichen Umfang zur de-novo Synthese der Cinnamoylputrescine in der Lage wie die freien Zellen. Durch die Immobilisierung wurde die Stabilität der Zellen erhöht, was besonders an der Verzögerung der Zelllyse zu bemerken war (Abb. 6 und 12a). Man könnte versuchen durch Zufütterung von wichtigen Medienbestandteilen oder anderen Vorstufen, die Nutzbarkeit der immobilisierten Zellen zu verlängern, aber eine biotechnologische Anwendung immobilisierter Zellen läßt sich nur verwirklichen, wenn die Produkte in das Medium gelangen. Spontan wurde bei immobilisierten Tabakzellen keine Abgabe der Cinnamoylputrescine in das Medium festgestellt. Deshalb wurden Optimierungsversuche, wie sie oben angedeutet wurden, zugunsten von Permeabilisierungsversuchen zurückgestellt.

3.1.7. Permeabilisierung von Tabakzellen

Die Cinnamoylputrescine werden in der Vakuole gespeichert. Da sie nach der Immobilisierung nicht spontan von den Zellen abgegeben wurden, muß die Plasmamembran und der Tonoplast für diese Verbindungen permeabel gemacht werden. Aus der Literatur ist eine Vielzahl von Permeabilisierungsgenzien bekannt (Felix et al. 1981, Felix 1982, Felix und Mosbach 1982, Brodelius und Nilsson 1983). Als erfolgversprechend für die Permeabilisation pflanzlicher Zellkulturen wurde von mir Dimethylsulfoxyd (DMSO), 1-Propanol, Chloroform, Ether und Chitosan ausgewählt. Freie und immobilisierte TX4-Zellen wurden für 1 Stunde mit den verschiedenen Agenzien behandelt. Danach wurde die Vitalität der Zellen über den Fluoresceindiacetat-Test (Widholm 1972) bestimmt (Abb. 14). Als Maß für die Permeabilisierung wurde der Polyphenolgehalt im Medium mit dem Folin-Test gemessen. Die Polyphenolmenge, die nach dem Aufkochen der Zellen oder Kugeln im Medium vorlag, wurde als maximaler Wert der Permeabilisierung genommen und als 100% gesetzt (Abb. 15).

Die Zellen, die mit DMSO, 1-Propanol und Chloroform behandelt worden waren, zeigten noch eine Vitalität von ca. 40-50%. Bei den

übrigen Ansätzen fiel sie noch stärker ab. Die "beste" Permeabilisierung wurde in diesem Experiment mit 10% 1-Propanol erreicht, wobei ca. 30% der Zellen im Vitalitätstest positiv waren und 40% der Polyphenole im Medium zu finden waren (Abb. 15). Die permeabilisierten, in ihrer Vitalität geschädigten Zellen färbten sich dunkel. Diese Erscheinung trat auch bei alten Kulturen auf und ist ein Zeichen für die Oxidation der Cinnamoylputrescine durch Peroxidasen oder Phenoloxidasen.

Die Permeabilisierung verlief in den meisten Fällen nicht sehr erfolgreich, da relativ wenig ausgeschieden wurde. Nur bei sehr starker Schädigung der Zellen waren nennenswerte Polyphenolgehalte im Medium nachzuweisen.

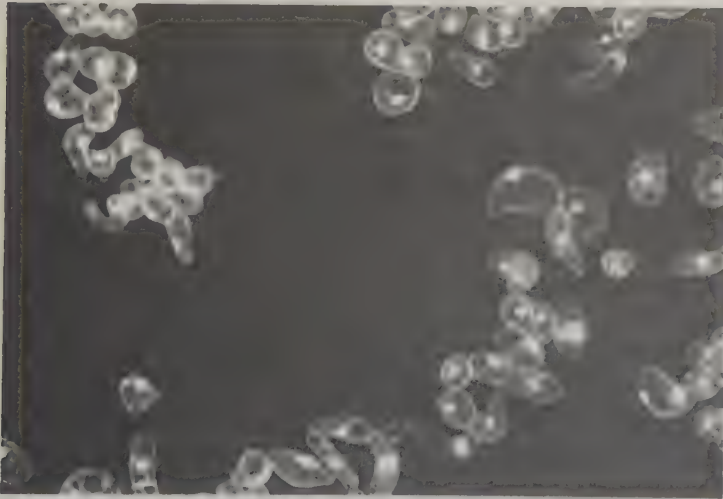
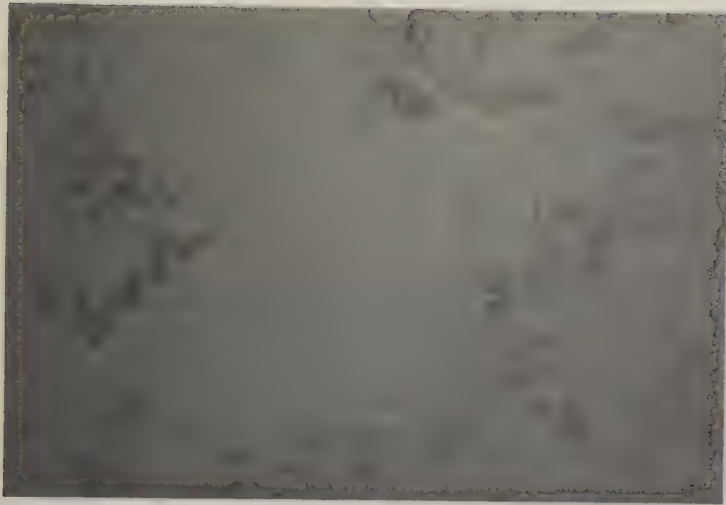


Abb. 14: Vitalitätstest mit unbehandelten TX4-Zellen (10 Tage alt) im MX-Medium mit 0.01% Fluoresceindiätylatlösung die Vergrößerung ist 73fach. Das obere Bild zeigt eine Lichtaufnahme der Zellen. Im unteren Bild sind die, im kurzwelligen Licht (200-350 nm) fluoreszierenden, vitalen Zellen abgebildet.

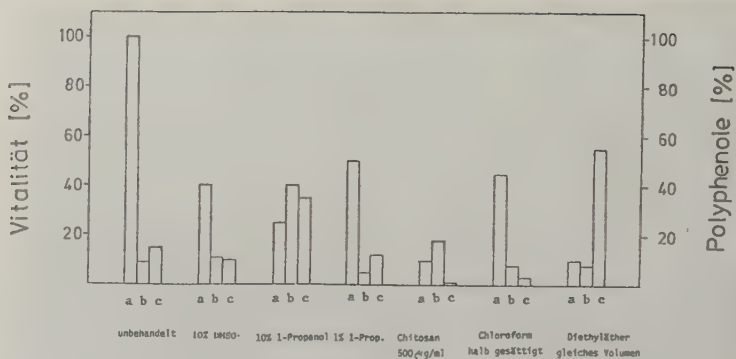


Abb. 15: Vitalität (a) und Polyphenolgehalt im Medium von freien (b) und immobilisierten (c) TX4-Zellen: 2.0 g Frischmasse pro 20 ml 6% Mannitollösung wurden für 1 Stunde mit den verschiedenen Agenzien permeabilisiert. Die Polyphenolgehalte im Medium von gekochten Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Der Vitalitätstest mit Fluoresceindiaceetat gibt nur Aufschluß über die Aktivität der Acetylrasen in den Zellen. Ob eine spezifische Biosyntheseleistung der Zellen durch eine experimentelle Maßnahme beeinflußt wird, kann daraus nicht abgesehen werden. Es ist durchaus denkbar, daß in geschädigten Zellen, in denen die Acetylrasen nicht mehr arbeiten, andere Enzyme aktiv bleiben. Die Biosynthese der Cinnamoylputrescine oder einzelne Syntheseschritte könnten möglicherweise noch ablaufen. Solche behandelten Zellen könnten als Enzymreaktoren für Biotransformationen benutzt werden. Nach einer Permeabilisierung der Zellen ist vermutlich eine Vielzahl von Enzymen frei zugänglich für Verbindungen, die bereits in den Zellen sind oder von außen zugefüttert werden können.

Die Fütterung von markiertem L-Phenylalanin an permeabilisierte Zellen sollte erste Anhaltspunkte über den Zustand des Sekundärstoffwechsels nach der Behandlung geben. Als Permeabilisierungsagens empfahl sich aus obigen Ergebnissen in erster Linie das 1-Propanol.

3.1.8. Permeabilisierung von TX4-Zellen mit 1-Propanol

Mit verschiedenen 1-Propanolkonzentrationen wurden freie oder immobilisierte TX4-Zellen 30 Minuten lang permeabilisiert. In der Abbildung 16 ist der Polyphenolgehalt im Medium nach 24 Stunden wiedergegeben. Aus den Zellen konnte eine Polyphenolmenge nach dem Folin-Test von rund 200 E_{725nm} extrahiert werden. In der Kontrolle befanden sich etwa 10% dieser Polyphenolmenge im Medium und dieser Anteil konnte durch die Permeabilisierung auf über 30% bei den immobilisierten Zellen, die mit 5% 1-Propanol behandelt wurden, gesteigert werden. Bei den permeabilisierten, immobilisierten Zellen war der Polyphenolgehalt des Mediums stets höher als bei den vergleichbaren Ansätzen mit freien Zellen. Vielleicht

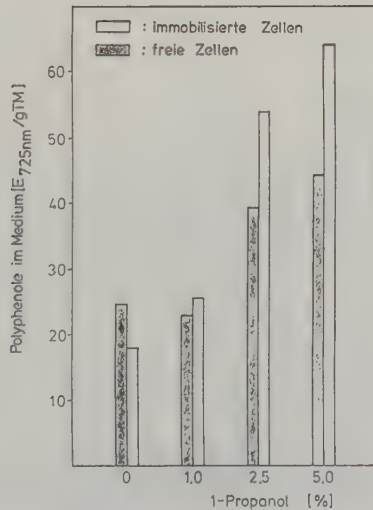


Abb. 16: Polyphenolausscheidung von freien und immobilisierten TX4-Zellen, die mit 1, 2.5 und 5% 1-Propanol permeabilisiert wurden. Animpfdichte 2.5 g Frischmasse pro 20 ml. Analyse 24 Stunden nach der Permeabilisation.

hat das Ca-Alginat einen Einfluß auf die geschädigte Zellwand. Die Matrix könnte aufgrund ihrer funktionellen Gruppen oder der

Ca^{2+} -Ionen in Wechselwirkung mit Membranbestandteilen der geschädigten Zellwand treten und so zu einer verstärkten Permeabilisierung führen.

Die immobilisierten, permeabilisierten Zellen erwiesen sich als einfacher zu handhaben und waren auch unempfindlicher gegenüber einem Medienwechsel. Ferner erbrachten sie bessere Ergebnisse in bezug auf die Ausscheidung von Inhaltsstoffen. Deshalb wurden im folgenden Versuch nur immobilisierte Zellen mit 1-Propanol permeabilisiert. Die Polyphenolgehalte im Medium sind ein Maß dafür, welcher Anteil an Inhaltsstoffen durch die Permeabilisierung in das Medium gelangt. Die Cinnamoylputrescine machen bei den intakten Zellen ca. 80% der Gesamtpolyphenole aus (Berlin et al. 1982).

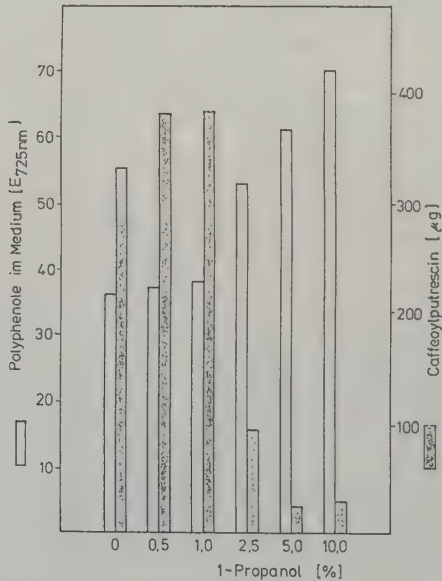


Abb. 17: Polyphenol- und Cinnamoylputrescingehalte im Medium nach 24 Stunden nach der Behandlung. Je 1.0 g Frischmasse immobilisierter TX4-Zellen in 20 ml verd. MX-Medium wurden mit 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 und 10% 1-Propanol permeabilisiert. Die Polyphenolgehalte wurden durch den Folin-Test, der Anteil an Cinnamoylputrescinen wurde durch HPLC ermittelt.

Die Dunkelfärbung permeabilisierter Kulturen und des Mediums ließ jedoch vermuten, daß irgendetwas mit den Cinnamoylputrescinen geschehen war. In diesem Fall ist der Folin-Test nur bedingt aussagekräftig. Die Medienproben wurden daher zusätzlich mit der HPLC untersucht (Abb. 17).

Da die Cinnamoylputrescine mehr als 80% der Gesamtphenole in Tabakzellen ausmachen (Berlin et al. 1982) entspricht E₇₂₅ von ca. 30 ungefähr 300 µg Caffeoylputrescin. Medien von Kugeln, die mit 0.5% und 1.0% 1-Propanol behandelt wurden, weisen nur geringe Veränderungen dieses Verhältnisses auf. Bei den Ansätzen, die mit 2.5-10% 1-Propanol behandelt wurden, ergab sich eine signifikante Steigerung der Polyphenolgehalte im Medium. Die Caffeoylputrescingehalte gingen dagegen drastisch zurück. Das Caffeoylputrescin muß bei diesen Ansätzen durch die Behandlung verändert worden sein. Denkbar wäre, daß die Cinnamoylputrescine, nachdem sie nicht mehr geschützt in der Vakuole vorlagen, von Peroxidasen oder Phenoloxidasen oxidiert wurden. Eine ausreichende Permeabilisierung schädigte die Zellen so stark, daß die Cinnamoylputrescine nicht nur ins Medium abgegeben, sondern auch weitestgehend zerstört (oxidiert) wurden. Die Permeabilisierung der Zellen, die sämtliche Membranstrukturen beeinflusst, führt zwar zur Freigabe der in der Vakuole gespeicherten Cinnamoylputrescine, aber auch andere Verbindungen wie Enzyme werden aus den Kompartimenten der Zelle gelöst. Viele unspezifische Reaktionen sind dann möglich und haben vermutlich bei den höheren Konzentrationen von 1-Propanol dazu geführt, daß die Cinnamoylputrescine nicht erhalten blieben.

3.1.9. Ausscheiden von markierten Verbindungen aus TX4-Zellen durch Permeabilisierung

Es war gezeigt worden, daß Tabakzellen gefüttertes L-(U-¹⁴C)Phenylalanin in die Cinnamoylputrescine einbauen (3.1.4.). Permeabilisiert man nun solche Zellen, so kann man anhand der Radioaktivitätsverteilung in den Zellen gegenüber dem Medium zusätzliche Aussagen über den Grad der Permeabilisierung machen. Es wurden je Ansatz 2.5g Frischmasse an freien oder immobilisierten TX4-Zellen

in 20 ml verdünnten MX-Medium mit 0.5 uCi L-(U- ^{14}C)Phenylalanin gefüttert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden waren bei allen Ansätzen nur noch 10% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge im Medium vorhanden. Nun wurden die Zellen mit Chloroform und verschiedenen 1-Propanolkonzentrationen permeabilisiert. Chloroform wurde als zusätzliches Permeabilisierungsmittel eingesetzt, da es die Zellen stark geschädigt hatte (Abb. 11) und hier als Negativbeispiel fungieren sollte. Die Tabelle 4 gibt die Radioaktivitätsverteilung 24 Stunden nach der Permeabilisierung wieder.

Anhand des Radioaktivitätsanteiles im Medium nach der Permeabilisierung (Tab. 4b) ist zu sehen, daß nur geringe Mengen abgegeben wurden. Mit höherem Permeabilisierungsgrad geht der mit dem MCW-Gemisch extrahierbare Teil der Radioaktivitätsmenge aus den Zellen von 50% bei der Kontrolle bis zu 2% der eingesetzten Radioaktivitätsmenge rapide zurück. In der Bilanz der gefundenen Radioaktivitätsmenge fehlten bei den behandelten Zellen im Extremfall 30-40% gegenüber der Kontrolle. Diese Beobachtung ergänzt die Ergebnisse der vorherigen Permeabilisierungsversuche und stützt die Vermutung, daß die Cinnamoylputrescine durch Peroxidasen oder Phenoloxidasen oxidiert wurden. Diese Verbindungen polymerisieren sehr leicht und sind dann nicht mehr extrahierbar.

Tab. 4: ^{14}C -Radioaktivität (%) im verd. MX-Medium und dem Zellextrakt von 1.0 g freien oder immobilisierten TX4-Zellen, die mit markiertem L-Phenylalanin gefüttert und nach 24 Stunden permeabilisiert wurden; a) 24 Stunden nach der Fütterung b) 24 Stunden nach der Permeabilisierung.

	Medium		Zellextrakt	total
	a)	b)		
Kugeln:				
Kontrolle	11	7	49	56
Chloroform	11	14	3	17
1% 1-Prp.	9	7	50	57
2.5% 1-Pr.	9	15	10	25
5.0% 1-Pr.	9	16	8	24
freie Zellen:				
Kontrolle	10	6	50	56
Chloroform	11	26	2	28
1% 1-Prp.	10	10	47	57
2.5% 1-Pr.	12	20	17	37
5.0% 1-Pr.	10	14	2	16

Zusammenfassend ist über die Permeabilisierung von Tabakzellen zu sagen, daß eine erhöhte Polyphenolmenge in das Medium gelangte (bis zu 30%). Die dazu nötige 1-Propanolkonzentration hob jedoch anscheinend jegliche Kompartimentierung auf, so daß die Cinnamoylputrescine zerstört wurden und im Medium nur als phenolische Verbindungen nachgewiesen werden konnten. Ein nicht extrahierbarer Anteil blieb in den Zellen zurück. Die Produkte der Tabakkulturen ließen sich nicht durch die Permeabilisierung gewinnen. Die Cinnamoylputrescine waren zu instabil. Eine Permeabilisierung erscheint nur sinnvoll, wenn neben dem Erhalt der Syntheseaktivität die Stabilität des Produktes gewährleistet ist. Beides war für das System Cinnamoylputrescine in permeabilisierten immobilisierten Tabakzellen nicht der Fall. Im folgenden Abschnitt soll durch

Hierzu wurden freie oder immobilisierte TX4-Zellen mit Chloroform und 1-Propanol permeabilisiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen

Tab. 5: ^{14}C -Radioaktivität (%) im Medium und im Zellextrakt permeabilisierter freier und immobilisierter TX4-Zellen; 2.5 g Frischmasse an Zellen/ 20 ml verd. MX-Medium wurden mit 115 μl Chloroform oder mit 1-Propanol permeabilisiert und nach 24 Stunden mit 0.5 μCi L-(U- ^{14}C)Phenylalanin gefüttert.

	Radioaktivität				(%)	
	Medium	Zelleextrakt			total	
	H ₂ O	EtAc	MCW	H ₂ O	EtAc	
freie Zellen:						
0.5% 1-Prop.	16	3.5	45	21	0.7	61
1.0% 1-Prop.	16	2.6	45	26	0.7	61
2.5% 1-Prop.	30	3.2	4	2	0.4	34
5.0% 1-Prop.	28	2.9	6	3	0.5	34
Chloroform	90	0.7	6	4	0.1	96
Kontrolle	6	0.8	55	31	0.6	61
immob. Zellen:						
0.5% 1-Prop.	4	0.7	44	24	0.6	48
1.0% 1-Prop.	10	2.4	38	16	1.0	48
2.5% 1-Prop.	21	6.8	9	3	1.5	30
5.0% 1-Prop.	18	5.0	9	3	1.0	27
Chloroform	64	0.5	10	6	0.1	74
Kontrolle	5	0.1	59	42	0.9	64

mit L-(U-¹⁴C)Phenylalanin gefüttert und nach weiteren 24 Stunden geerntet. Es wurde die Radioaktivitätsverteilung im Medium und den Zellextrakten bestimmt (Tabelle 5).

Die mit 1-Propanol permeabilisierten Zellen nahmen die markierten Verbindungen besser auf als die mit Chloroform behandelten. Wie eine Chromatographie der Proben zeigte, ging die im Medium verbliebene Aktivitätsmenge auf nicht aufgenommenes Phenylalanin zurück. Die verringerte Aufnahme läßt sich damit erklären, daß wohl ein großer Teil der Zellen nach der Permeabilisierung abgestorben war.

Mit steigender 1-Propanolkonzentration waren wieder weniger Phenylalaninmetabolite aus den Zellen extrahierbar. Wie im vorherigen Versuch wurde das Phenylalanin in den Rückstand eingebaut. Ob dieser Vorgang über die Cinnamoylputrescine läuft, konnte nicht gezeigt werden. Daß Phenylalanin umgesetzt wurde, erkennt man an der gesteigerten Radioaktivitätsmenge im Ethylacetatextrakt der Zellen, die mit 0.5-5% 1-Propanol permeabilisiert wurden. Eine genauere Analyse der Ethylacetatphase ergab, daß hier radioaktiv markierte Verbindungen vorlagen, die in unbehandelten Zellen nicht vorkamen.

3.1.11. Aufklärung der neuen Verbindungen

Für die Aufklärung der neuen Verbindungen wurden größere Zellmengen mit 0.5 oder 1.0% 1-Propanol permeabilisiert und nach 1 oder 2 Tagen mit markiertem Phenylalanin gefüttert. Nach 24 h wurde die Ethylacetat-Phase des Mediums ausgeschüttelt und chromatographisch auf Kieselgelplatten getrennt. In den Laufmitteln I-III konnte eine radioaktive Bande mit einem R_f -Wert von ca. 0.9 isoliert werden, die im Laufmittelsystem IV weiter aufgetrennt werden konnte (Abb. 18). Die radioaktiven Banden wurden mit NMR und GC-MS-Untersuchungen analysiert.

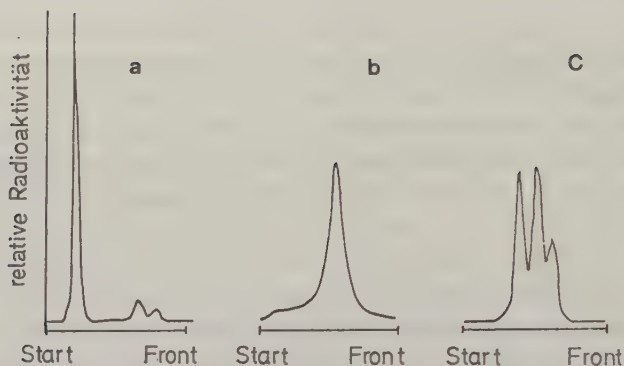


Abb. 18: Radioaktivitätsverteilung von a) Phenylalaninstandard und den Ethylacetatextrakten des Mediums der mit 1% 1-Propanol permeabilisierten b) freien und c) immobilisierten TX1-Zellen, die im Laufmittelsystem IV aufgetrennt waren.

Als eine der neuen in der Ethylacetatphase auftretenden Verbindungen konnte Coniferylalkohol identifiziert werden. Diese Verbindung lief im Laufmittelsystem IV mit einem R_f -Wert von 0.4. Die Abbildung 19 gibt das NMR-Spektrum dieser Verbindung wieder. Das Substitutionsmuster dieser aromatischen Verbindungen konnte durch die Signale in der aromatischen Region (6-7 ppm) identifiziert werden. Die Identität der Verbindung mit Coniferylalkohol wurde durch ein Vergleichsspektrum mit authentischem Coniferylalkohol bestätigt (Abb. 19)

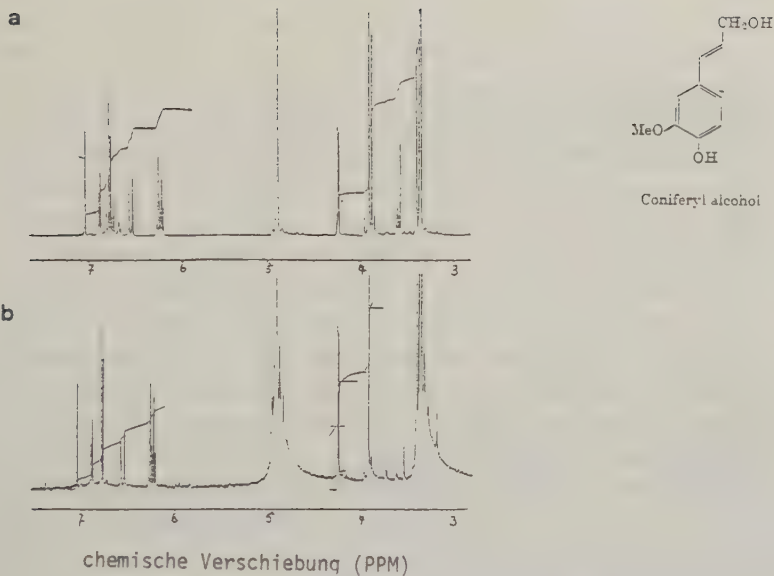


Abb.19: NMR-Spektren von a) synthetischen und b) aus der Ethylacetatphase des Mediums isolierten Conypherylalkohol; ^1H 400 MHz NMR-Spektrum mit einem Bruker WM-400 bei Raumtemperatur und CD_3OD als Lösungsmittel.

Da sich Verbindungen wie Coniferylalkohol für GC-MS Untersuchungen eignen, wurden auf gleiche Weise isolierte Verbindungen mittels dieser Technik untersucht. Die Banden mit einem R_f -Wert von 0.5 im Laufmittelsystem IV wurden der GC-MS-Analyse unterworfen (Abb. 20). Der "Scannreport" des Gaschromatographen zeigt, daß diese DC-Zone nur noch eine Hauptkomponente enthielt. Anhand des Massenspektrums wurde die Verbindung als Xanthoxylin identifiziert.

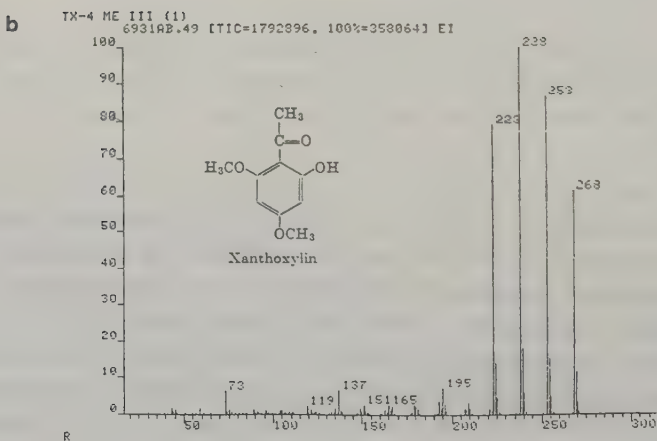
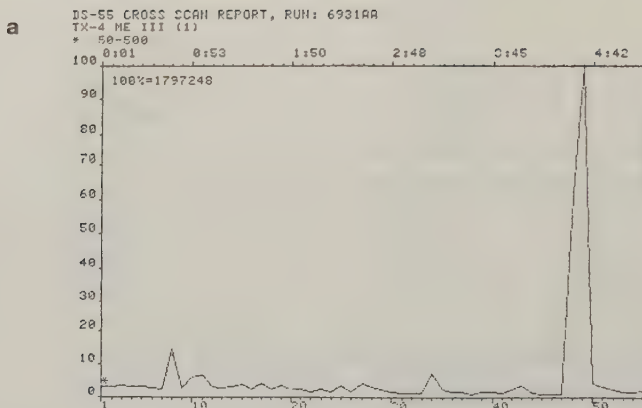


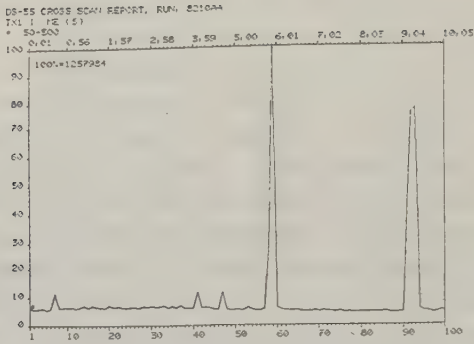
Abb. 20: GC-MS-Messung der Hauptkomponente (R_f -Wert von 0.5) im Laufmittelsystem IV aus der Ethylacetatphase des Mediums von permeabilisierten TX1-Zellen: a) Scannreport und b) Massenspektrum.

In einem weiteren Ansatz wurden 7 Tage alte TX1-Zellen auf IM I-Medium umgesetzt und mit 1% 1-Propanol für 30 Minuten permeabilisiert. Parallel dazu wurden Zellen in Alginat immobilisiert und ebenfalls permeabilisiert. Nach 24 Stunden wurden beide Ansätze mit L-Phenylalanin gefüttert. Zu den freien Zellen wurden 40 mg L-Phenylalanin und 2.0 uCi L-(U-¹⁴C)Phenylalanin gegeben. Die immobilisierten Zellen wurden mit 6.3 mg L-Phenylalanin und 1.0 uCi gefüttert. Nach weiteren 24 Stunden wurden Zellen und Medien geerntet und aufgearbeitet. Die Ethylacetatphase des Mediums wurde im Laufmittelsystem IV auf Kieselgel aufgetrennt. Die radioaktive Hauptbande mit einem RF-Wert von 0.6 wurde ausgekratzt und mit 50% Methanol eluiert. In der GC-Messung für diese Probe tauchten im "Scanreport" zwei große Peaks mit einem Retentionsindex von 59 und 92 auf. Die Massenspektren dieser beiden Peaks waren identisch. Anhand von Referenzspektren konnte die Verbindung als p-Coumarsäure identifiziert werden (Abb. 21). Bei den beiden Peaks handelt es sich wahrscheinlich um die cis- und trans-Isomere, die sich durch die Aufarbeitung der Probe gebildet haben.

Die Radioaktivitätschromatogramme der Proben, denen markiertes Phenylalanin gefüttert worden war, deuteten darauf hin, daß in geringen Mengen weitere Metabolite auftreten. Für deren Aufklärung reichte jedoch die GC/MS-Messung nicht aus. Eine präparative Gewinnung dieser "Nebenkomponenten" wurde unterlassen, da diese Verbindungen, gemessen an ihrer Markierung, in unterschiedlichen Ansätzen unterschiedlich stark akkumulierten.

Um zu sehen, welche Verbindungen innerhalb der Zellen akkumulierten, wurden auch die Zellextrakte untersucht. In der Ethylacetatphase fanden sich nur geringe Radioaktivitätsmengen. Die Hauptradioaktivitätsmenge (ca. 30%) befand sich in der wässrigen Phase. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse war nicht anzunehmen, daß es sich dabei um Cinnamoylputrescine handelt.

a



b

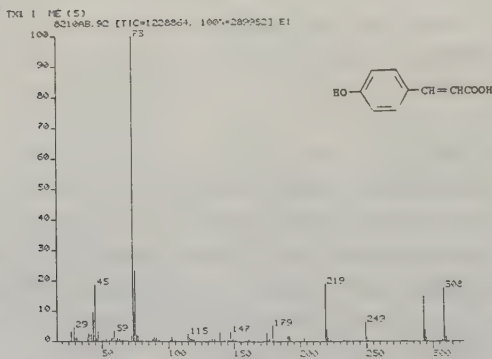


Abb. 21: GC-MS-Messung der p-Coumarsäure aus der Ethylacetatphase von permeabilisierten Tabakzellen, a) Scanreport und b) Massenspektrum.

Die wässrige Phase des Zellextraktes wurde mit dem Laufmittelsystem I chromatographiert. Die radioaktiv markierte Bande (R_f -Wert 0.5) wurden mit 50% Methanol eluiert und mit NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 22). Das NMR-Spektrum weist im Bereich der chemischen Signalverschiebung von 5.6-8.0 ppm gegenüber Tetramethylsilan die Signale für das Aglykon auf. Für die Signale des

Aglykons findet man anhand der Kopplungskonstanten ($^3J(7-8)$) die cis-und-trans-Konfiguration der Protonen am C₇ und C₈-Atoms. Dies ist auf die Aufarbeitung zurückzuführen. In vitro ist nur die trans Konfiguration vorhanden. Im Bereich von 3.2-4.0 und 5.5-5.6 ppm sind die Signale des Zuckers zu finden. Der Zucker konnte als Glukose identifiziert werden. Daß es sich um eine 1-O- β -glukosidische Bindung handelt ist an den Signalen bei 5.5 ppm zu ersehen. Es besteht eine vicinale Kopplung der Protonen am C₁ und C₂ der Glukose. Diese Signale erscheinen als Dublett. Anhand einer Referenzsubstanz von D.Strack (Universität Köln) konnte die Verbindung als β -O- β -(p-Coumaryl)glucosid bestätigt werden.

Die identifizierten Verbindungen sind Metabolite des Ligninstoffwechsels, wobei der Coniferylalkohol bereits eine direkte Vorstufe des Lignins ist. In den permeabilisierten Zellen müssen noch eine Reihe von Enzymen aktiv gewesen sein. Die identifizierten Verbindungen deuten darauf hin, daß zumindest die PAL, die Phenylalanin zu Zimtsäure umsetzt, aktiv war und Hydroxilierungen, Methylierungen sowie Glykosidierungen abliefen. Der bei intakten Zellen übliche Einbau des Phenylalanins in die Cinnamoylputrescine fand nicht mehr statt. Dieser Syntheseweg umfaßt mehrere Schritte, von denen anzunehmen ist, daß sie membranassoziiert oder membrangebunden sind. Durch die Permeabilisierung wird nun die Kompartimentierung der Zellen beeinträchtigt oder zerstört. Einzelne Teile des Syntheseweges können dann noch ablaufen und hinzu können unspezifische Enzymreaktionen kommen. Dies führt dazu, daß neue Verbindungen entstehen, die in das Medium abgegeben werden oder in den Zellen akkumulieren. Zum großen Teil werden Verbindungen gebildet, die durch alkoholische Extraktion nicht mehr in Lösung gebracht werden können.

Die hier isolierten Verbindungen sind ohne kommerzielle Bedeutung, jedoch zeigt die zusätzliche Biosyntheseaktivität von permeabilisierten Zellen ein weitere mögliche Anwendung der pflanzlichen Zellkulturen. Permeabilisierte immobilisierte Zellen können als Enzymreaktoren neue Syntheseleistungen erbringen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist nun die Frage, wie lange diese Syntheseleistung aufrecht erhalten werden kann.

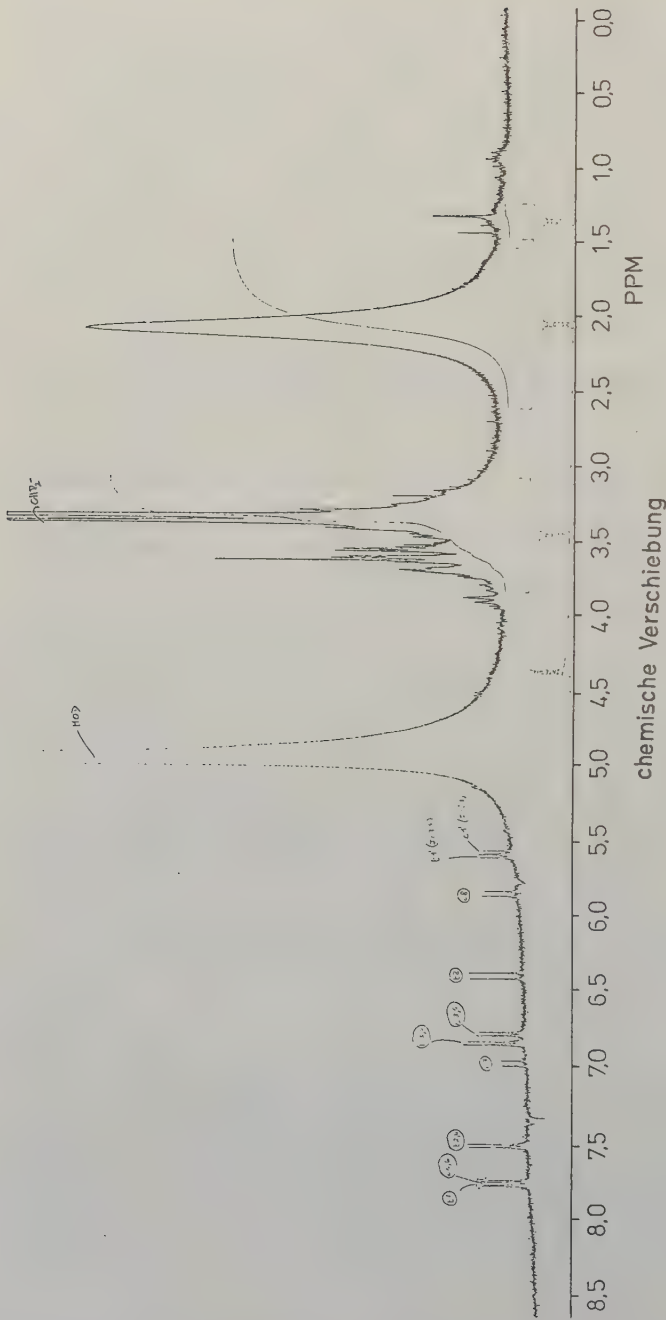


Abb. 22: NMR-Spektrum von 1-O-β-(p-Coumaryl)glucosid aus der wässrigen Phase des Zellextraktes, präparativ über DC im LM I getrennt; ^1H 400 MHz-NMR-Spektrum mit einem Bruker WM 400 bei Raumtemperatur und CD_3OD als Lösungsmittel.

3.1.12. Aufnahme von markiertem L-Phenylalanin zu unterschiedlichen Kulturzeiten

Permeabilisierte TX1-Zellen waren bei den geringen und mittleren 1-Propanolkonzentrationen noch nach 24 h in der Lage, Phenylalanin aufzunehmen und umzusetzen.

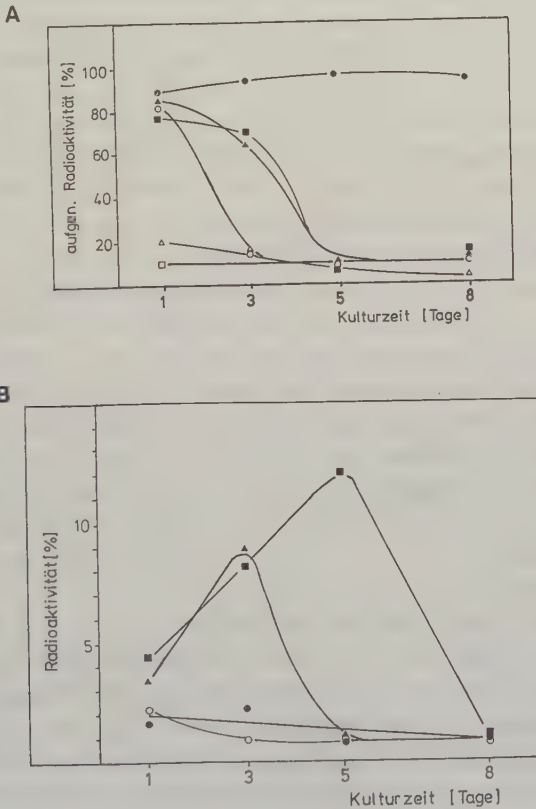


Abb. 23: Aufnahme von 0.5 uCi L-(U-¹⁴C)Phenylalanin jeweils 24 Stunden vor der Ernte gefüttert und b) mit Ethylacetat aus dem Medium extrahierte Radioaktivitätsmenge. Je Ansatz wurden 1.0 g immobilisierter TX1-Zellen in 20 ml verd. MX-Medium inkubiert und mit 0.5% ■—■, 1.0% ▲—▲, 5.0% ●—● und 10% 1-Propanol permeabilisiert; Kontrolle ○—○.

Zur Untersuchung der Dauer der enzymatischen Aktivität der permeabilisierten Zellen wurden Ansätze zu verschiedenen Zeiten für jeweils 24 h mit markiertem Phenylalanin gefüttert (Abb. 23). Von den unbehandelten Zellen wurde in allen Ansätzen jeweils 90-95% der angebotenen Radioaktivitätsmenge innerhalb der 24 h aufgenommen. Bei den mit 5.0 und 10% 1-Propanol behandelten Ansätzen war noch 90% der Aktivitätsmenge als L-Phenylalanin im Medium zu finden. Die Radioaktivitätsmenge, die aus dem Medium verschwunden war, entsprach der Menge, die auch von toten immobilisierte Zellen gebunden wird (3.1.4). Die Zellen in den Kugeln, die mit hohen Konzentrationen an 1-Propanol permeabilisiert wurden, konnten das angebotene L-Phenylalanin nicht mehr umsetzen.

Die Aufnahme von Phenylalanin war bei den Zellen, die mit 0.5 und 1.0% 1-Propanol permeabilisiert worden waren, bis zum 3. Kulturtag nur leicht herabgesetzt, fiel danach jedoch stark ab (Abb. 23). Beträchtliche Mengen der Radioaktivität ließen sich hier mit Ethylacetat aus dem Medium ausschütteln. Am 8. Tag waren jedoch auch bei diesen Ansätzen die Radioaktivitätsgehalte in der Ethylacetatphase ebenso gering wie bei der Kontrolle und den stark permeabilisierten Ansätzen, und im Medium war nur markiertes Phenylalanin zu finden. Die mit 0.5% und 1.0% permeabilisierten Zellen waren noch für 3-4 Tage in der Lage das Phenylalanin aufzunehmen.

Wie der Anteil der Radioaktivitätsmenge in der Ethylacetatphase des Mediums zeigt, waren die leicht permeabilisierten Zellen nur über maximal 5 Tage in der Lage, die neue Syntheseleistung aufrecht zu erhalten. Allerdings wurden mit ca. 12% der Gesamtradioaktivitätsmenge bei 0.5% 1-Propanol recht beachtliche Einbauraten erzielt. Die Permeabilisierung mit 0.5% 1-Propanol hat sich als besonders geeignet für die biotransformatorische Bildung von Verbindungen erwiesen, die mit Ethylacetat aus dem Medium extrahiert werden konnten.

3.1.13. Zusammenfassung der Ergebnisse mit *N. tabacum*-Zellen

Die immobilisierten Zellen von *N. tabacum* waren annähernd im

gleichen Umfang wie freie Zellen zur de-novo Synthese der Cinnamoylputrescine in der Lage (Abb. 6 und 12). Es wurde keine Steigerung der Sekundärstoffbildung nach der Immobilisierung erzielt. Die Anwendung von Permeabilisierungsagentien, die eine Produktabgabe bewirken sollen, war nicht erfolgreich, da die Cinnamoylputrescine zu instabil waren und bei erfolgreicher Permeabilisation (hohe Polyphenolmengen im Medium) zerstört wurden (Abb. 17). Auch die in den Zellen verbliebenen Cinnamoylputrescine wurden oxidiert und polymerisiert und waren nicht mehr mit Alkohol extrahierbar (Tab. 4 und 5). Die von Shuler et al. (1982) berichtete Abgabe von Phenolen aus Tabakzellen, die in Hohlfasern eingeschlossen in einem zu 25% mit Chloroform gesättigtem LS-Medium ohne Phytohormone über längere Zeit inkubiert wurden, ist nach meinen Ergebnissen kritisch zu bewerten. Es ist unwahrscheinlich, daß es sich bei den Phenolen um die ursprünglich in den Zellen vorhandenen Verbindungen handelte. Leider wurden die Phenole nicht näher bestimmt.

Aus der Tatsache, daß in permeabilisierten Zellen Cinnamoylputrescine metabolisiert wurden und Phenylalanin weiter umgesetzt wurde, ist zu ersehen, daß noch eine Reihe von Enzymen nach der Permeabilisierung aktiv waren. Diese Enzyme, die durch die Aufhebung der Kompartimentierung in permeabilisierten Tabakzellen, an andere Substrate gelangten, ließen "neue" Verbindungen im Medium und in den Zellen akkumulierten, die als mehr oder weniger nahe Vorstufen der Ligninsynthese bekannt sind (Abb. 19-21). Die Unterschiedlichkeit der gefundenen Verbindungen bei den verschiedenen Ansätzen läßt darauf schließen, daß es sich nicht um ein stabiles System handelt, sondern daß die Produkte von dem physiologischen Zustand der Ausgangskultur und dem Permeabilisierungsgrad abhängen. Um die permeabilisierten Zellen zur Gewinnung von gewünschten Produkten zu nutzen, müßte nicht nur der bestmögliche physiologische Zustand gewählt werden, sondern er müßte unter strikter Einhaltung der Kulturbedingungen leicht bestimmbar und reproduzierbar sein. Diese zeitaufwendigen Arbeiten wären für Ligninvorstufen sicher nicht gerechtfertigt. Nichtsdestotrotz bleibt als generell wichtige Beobachtung die Tatsache, daß durch die Permeabilisierung von pflanzlichen Zellkulturen die

Biotransformationskapazität erweitert werden kann.

Das System "Cinnamoylputrescinproduktion in *Nicotiana tabacum*" kann durch Immobilisierung nicht verbessert werden. Die angeblichen Vorteile der Immobilisation, höhere und längere Syntheseleistung, schonendere Zellkultivierung und Abgabe der gewünschten Produkte ins Medium, trafen für dieses System nicht zu. Als Nebeneffekt wurde zum ersten Mal deutlich gezeigt, daß Reaktionen in permeabilisierten Zellkulturen ablaufen können, die in intakten Zellen nicht gesehen hat und die man anhand der Produktakkumulation nicht erwartet hatte.

3.2. Thalictrum rugosum

Die Ergebnisse aus den Permeabilisationsversuchen mit Tabakzellen haben gezeigt, daß die auszuschleusende Verbindung unter solchen Bedingungen nicht immer stabil ist. Für diese Technik kommen deshalb nur Naturstoffe in Frage, die nicht weiter umgesetzt werden. Ob eine Substanz ausreichend stabil ist, kann man eventuell an ihrer Struktur erkennen oder daran, wie beständig sie in der Kultur oder dem Medium ist. Man sollte vor allem Produkte aussuchen, die nicht von Phenolasen oder Peroxidasen angegriffen werden, da diese auch nach der Permeabilisierung der Zellen ihre Aktivität behalten.

Eine geeignete Verbindungsklasse für weitere Immobilisierungs-/Permeabilisierungsversuche schienen die Protoberberinalkaloide zu sein. Zum einen wird diese Verbindungsklasse unter Zellkulturbedingungen recht gut exprimiert. Gehalte von 10-15% wurden für Coptis japonica (Fukui et al. 1982, Sato et al. 1982) und Thalictrum minus (Nakagawa et al. 1984) beschrieben. Zum anderen war in diesem Zusammenhang interessant, daß eine Mutante Th. minus beschrieben wurde, die Alkaloide spontan ins Medium ausschied, wo sie als Nitrate auskristallisierten (Nakagawa et al. 1984). Dies veranlaßte mich, die nächsten Immobilisierung-/Permeabilisierungsversuche mit einer noch wenig charakterisierten Zellkultur von Th. rugosum durchzuführen. Da Thalictrum-Zellen möglicherweise über einen natürlichen Mechanismus der Alkaloidausscheidung verfügen, bestand die Hoffnung, daß vielleicht durch eine Immobilisation dieser "Mechanismus induziert" wird. Außerdem erschienen die Protoberberine stabil genug, um Permeabilisierungsversuche an der Kultur zu überstehen.

Die Th. rugosum-Kultur bildete spontan hohe Mengen an Isochinolinalkaloiden (5%). Als Hauptkomponenten wurden das

Aporphinalkaloid Magnoflorin und die Protoberberinalkaloide Columbamin und Berberin (Abb. 24) identifiziert (Kohl et al. in Vorbereitung). Zunächst mußte die vorhandene, aus großen Aggregaten bestehende Kultur in eine feine Suspension umgewandelt werden, damit sich die Zellen gleichmäßig in die Matrix einbetten ließen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, durch welche Faktoren des Mediums der Protoberberingehalt der Kultur beeinflußt wird, um gegebenenfalls ein geeignetes Produktionsmedium für die weiteren Versuche einsetzen zu können.

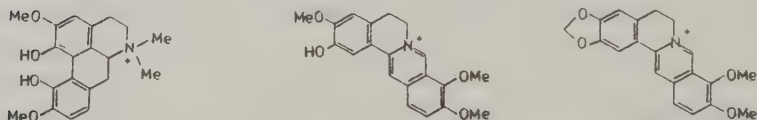


Abb. 24: Magnoflorin Columbamin Berberin

3.2.1. Etablierung und Charakterisierung einer feinen Suspensionskultur

Um eine gleichmäßige Suspensionskultur zu erhalten, wurden immer nur Zellaggregate subkultiviert, die durch ein 500 µm Nylonnetz gesiebt worden waren. Nach mehreren Kulturpassagen ließ die Tendenz zur Aggregation nach, und es wurde eine für die Immobilisierungen ausreichend fein suspendierte Kultur erhalten.

In einem ersten Versuch wurden die Zusammenhänge zwischen der Animpfdichte, dem Wachstumsverhalten und der Produktbildung für diese Kultur untersucht. Hierzu wurde die Ausgangskultur in mehreren Schritten mit neuem Wachstumsmedium verdünnt. Die Abbildung 25 zeigt das Wachstumsverhalten der verschiedenen Ansätze.

Die Th. rugosum-Kultur benötigte für gutes Wachstum und gute Produktbildung eine deutlich höhere Animpfdichte als andere schnell wachsende Kulturen, wie z.B. Tabak oder Catharanthus. Eine ausreichende Animpfdichte ist bei einem Inokulum von 60–90 g Frischmasse/l gegeben (Abb. 25), d.h. bei einer Verdünnung der angewachsenen Kultur von 1:3 bis 1:5.

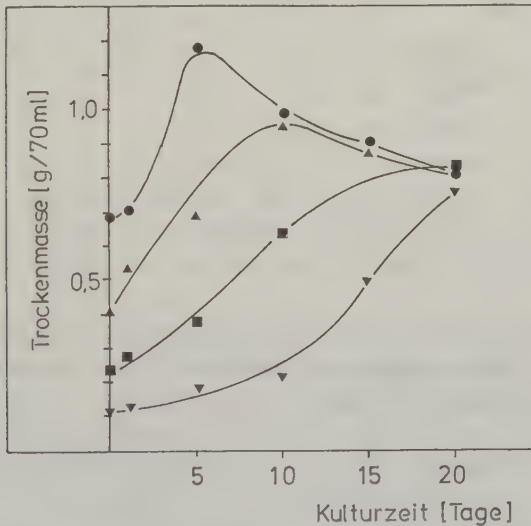


Abb. 25: Wachstumsverhalten und Alkaloidbildung von Th. rugosum-Zellen in 70 ml MX-Medium; die Ausgangskultur (17 Tage alt) wurde 1:2 ●—●, 1:3 ▲—▲, 1:5 ■—■ und 1:10 ▼—▼ mit neuem MX-Medium verdünnt.

Die Wachstums- und Produktionskinetik der Th. rugosum-Kultur ist in der Abbildung 26 dargestellt. Innerhalb eines Wachstumszyklus steigerte sich die Trockenmasse um das 4-fache, und der Gesamtalkaloidgehalt erreichte rund 3%. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen eine HPLC-Trennung der Hauptalkaloide und deren Akkumulationskurven während des Wachstumszyklus.

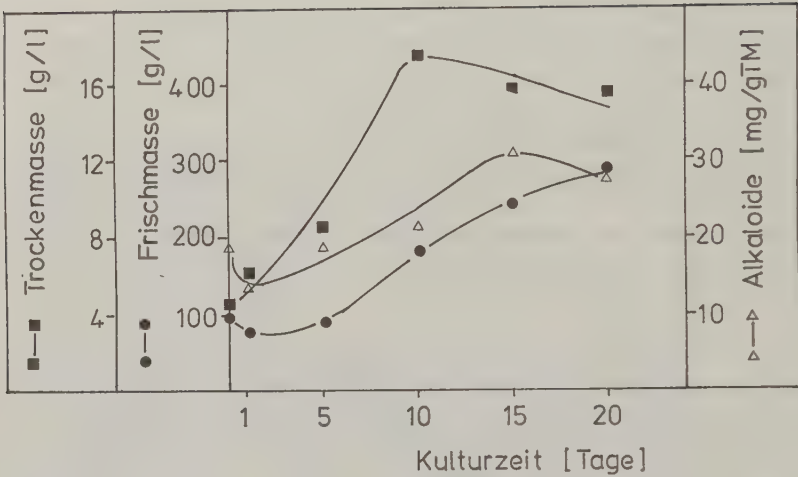


Abb. 26: Wachstums- und Produktkinetik der Suspensionskultur von Th. rugosum im MX-Medium; es wurden 17 Tage alte Zellen angeimpft (100 g/L).

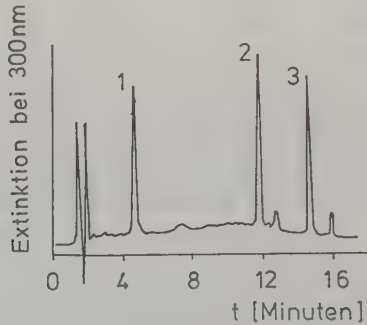


Abb. 27: HPLC-Trennung eines Methanol-Extraktes der Zellen von Th. rugosum. 1) Magnoflorin, 2) Columbamin und 3) Berberin; Trennbedingungen: Nucleosil C₁₈-Säule 10 µm, 90% H₂O (1% Ameisensäure und 0.7% Triethylamin/10% Acetonitril) gegen 50% (1% Ameisensäure und 0.7% Triethylamin/50% Acetonitril), V_L = 2 ml/min linearer Gradient und Detektion bei 300 nm.

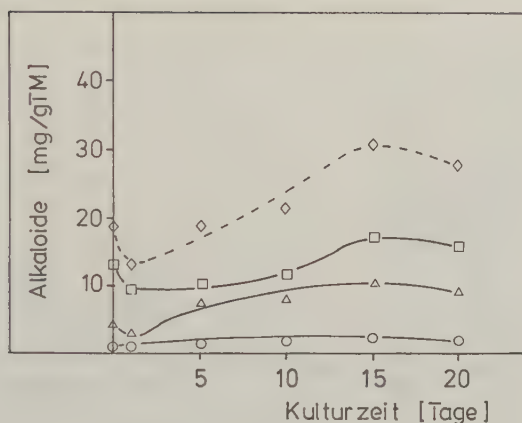


Abb. 28: Alkaloidgehalte von *Th. rugosum*-Zellen im MX-Medium; ○—○ Magnoflorin, □—□ Columbamin, Berberin und ◇---◇ Gesamtgehalt (Animpfdichte 100 g/L).

Die beiden Protoberberine Columbamin und Berberin sind die Hauptalkaloide. Das Aporphin Magnoflorin war nur in recht geringen Mengen vorhanden. In den größeren Kulturen, die von Kohl (unveröffentlicht) zur Strukturaufklärung herangezogen worden waren, war das Magnoflorin eine Hauptkomponente gewesen. Der niedrigere Alkaloidgehalt der feinen Suspensionskultur geht auf den stark reduzierten Magnofloringehalt zurück. Die Alkaloide wurden während der Wachstumsphase und besonders in der stationären Phase, nachdem die Zunahme der Trockenmasse abgeschlossen war, gebildet (Abb. 26).

In den weiteren Versuchen sollte geklärt werden, welche Medienbestandteile einen positiven Einfluß auf das Wachstumsverhalten und besonders auf die Produktbildung haben. Die Abbildung 29 zeigt die Entwicklung der Trockenmasse von *Th. rugosum*-Zellen im MX-Medium mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen und die Abbildung 30 die dazugehörigen spezifischen Alkaloidgehalte.

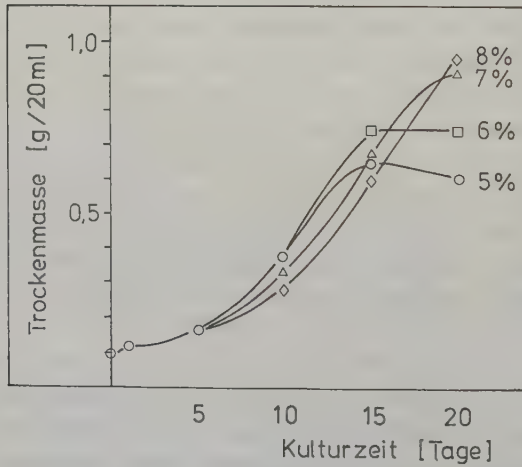
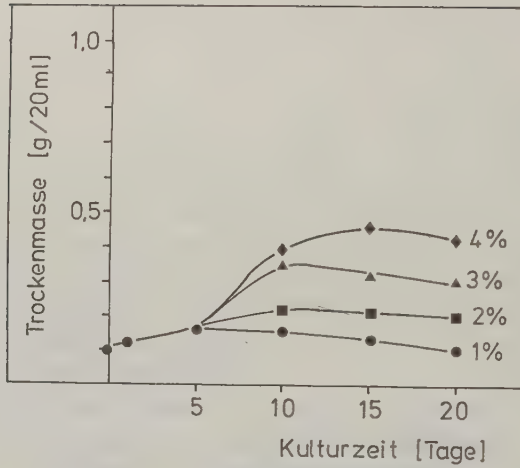


Abb. 29: Wachstumskinetik von *Th. rugosum*-Zellen im MX-Medium mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen; die Ausgangskultur war 17 Tage alt (Animpfdichte 100 g/L).

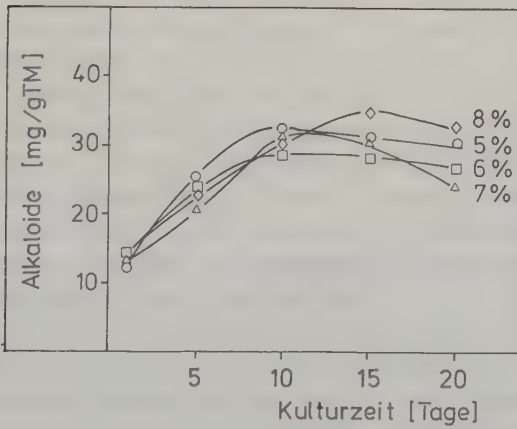
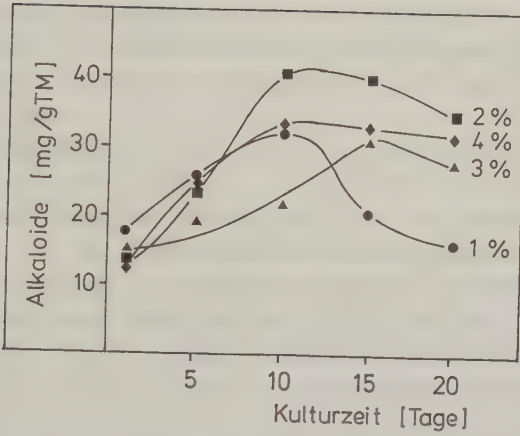


Abb. 30: Spezifische Alkaloidgehalte von *Th. rugosum*-Zellen im MX-Medium mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen; die Ausgangskultur war 17 Tage alt (Animpfdichte 100 g/L).

Die Zunahme der Trockenmasse bei den Ansätzen mit 7 und 8% Saccharose am Ende der Kulturzeit ging auf die Einlagerung von Zucker zurück (Abb. 29). Die hohen Zuckerkonzentrationen steigerten die spezifische Alkaloidbildung nur gering (Abb. 30), allerdings führte sie zu einer größeren Gesamtausbeute.

Ausgehend vom MX-Medium wurden nun die Stickstoff- und Phosphatgehalte variiert. Zusätzlich wurde mit MX O ein hormonfreies Medium getestet. Im MX NAA wurde 2,4-D durch verschiedene Konzentrationen von NAA ersetzt. Zu einem Ansatz wurde zusätzlich zum 2,4-D noch Kinetin gegeben. Die Ergebnisse für das Wachstum und die Alkaloidgehalte wurden im Verhältnis zu den entsprechenden Werten für die Kontrolle (MX) angegeben (Tabelle 6).

Die Einflüsse auf das Wachstum waren nicht sehr groß. Das bedeutet, daß das MX-Medium bereits ein gutes Wachstumsmedium für die Kultur ist. In einigen Fällen konnte jedoch der Alkaloidgehalt erheblich gesteigert werden, so im hormonfreien Medium (MX O) und in den Ansätzen, bei denen 2,4-D durch NAA ersetzt wurde. Da die Kultur aber nach 4 Passagen auf NAA-haltigem Medium ihr Wachstum einstellte, ist der Effekt hier eher auf das Fehlen eines wirksamen Phytohormones, als auf eine besondere Wirkung des NAA zurückzuführen. Eine Steigerung der Sekundärstoffbildung in hormonfreien Medien war schon für andere Kulturen berichtet worden (Zenk et al. 1977b; Knobloch und Berlin 1980, 1981; Roustan et al. 1982). Ein solches hormonfreies Produktionsmedium ist auch für die Immobilisierungsversuche mit Th. rugosum-Zellen geeignet, um ein mögliches Herauswachsen der Zellen aus den Kugeln (wie bei Tabakzellen beobachtet) zu vermeiden und verstärkte Sekundärstoffbildung zu erzielen. Die Medienversuche zeigten, daß durch eine Erhöhung der Zuckerkonzentration und Weglassen von 2,4-D der Alkaloidgehalt deutlich gesteigert wurde.

Tabelle 6: Wachstum und Alkaloidgehalt von Th. rugosum-Zellen in MX-Medien mit veränderten N- und P-gehalten oder geänderter Phytohormonzusammensetzung; Inokulum 2.0 g/20 ml. Die Daten geben die relativen Veränderungen gegenüber dem MX-Medium an.

Medien	Ernte nach 10 Tagen			Ernte nach 15 Tagen		
	TM	Alkaloidgehalte gesamt pro g/TM		TM	Alkaloidgehalte gesamt pro g/TM	
MX	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
MX 0.25NH ₄	1.45	0.87	0.60	1.06	0.83	0.78
MX 0.5 NH ₄	1.20	0.75	0.62	1.10	0.86	0.78
MX 0.75NH ₄	1.18	0.90	0.77	1.07	0.96	0.89
MX 0.25 N	1.54	0.99	0.64	1.07	0.78	0.73
MX 0.5 N	1.21	0.98	0.81	1.04	1.00	0.96
MX 0.75 N	1.09	0.90	0.83	1.07	0.90	0.84
MX 1.5 N	0.92	0.75	0.81	0.95	0.89	0.94
MX 10M ⁶ NAA	1.35	2.36	1.75	1.07	1.47	1.37
MX2x10M ⁶ NAA	1.33	1.90	1.45	1.02	1.79	1.75
MX5x10M ⁶ NAA	1.45	1.91	1.34	1.07	1.74	1.62
MX 2xP	1.11	0.97	0.87	1.28	1.14	0.89
MX 1.5xP	1.21	0.97	0.80	1.06	-	-
MX 0	1.16	2.27	1.96	0.94	2.07	2.19
MX Kinetin	1.07	1.14	1.08	1.01	1.26	1.24

In dieser Hinsicht waren die Ergebnisse ähnlich wie für Indolalkaloide aus C. roseus (Knobloch und Berlin 1981a) und die Benzophenanthridin-Alkaloide in Eschscholtzia californica (Berlin et al. 1983). Es wurde deshalb das für diese Kulturen entwickelte Produktionsmedium IM II benutzt. Es enthält im Gegensatz zum MX-Medium keine Phytohormone, verminderte Phosphat- und Stickstoffgehalte und 8% Saccharose.

3.2.2. Freie und immobilisierte Th. rugosum-Zellen im Produktionsmedium

Der Einfluß der Immobilisierung von Th. rugosum-Zellen auf die Alkaloidbildung im IM II-Medium wurde durch den Vergleich mit freien Zellen untersucht. Die beiden Ansätze wurden mit der gleichen Zellmasse beimpft. Die Abbildung 31 gibt die Entwicklung der Zellmasse und die Produktbildung im IM II-Medium für freie Zellen wieder.

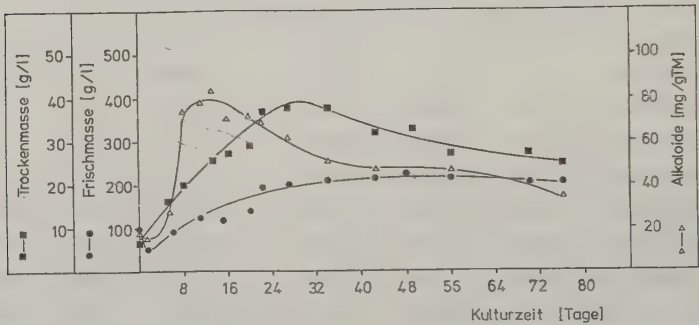


Abb. 31: Zellmasse und Alkaloidgehalt von freien Th. rugosum-Zellen im IM II-Medium; Animpfmenge 2.0 g einer 17 Tage alten Kultur/20 ml.

Die geringe Zunahme der Frischmasse zeigt, daß das Wachstum verringert war. Die hohe Trockenmasse geht auf die Einlagerung des Zuckers zurück. Der spezifische Alkaloidgehalt steigerte sich auf 8% gegenüber 3% im MX-Medium (Abb. 26).

In der Abbildung 32 ist der Alkaloidgehalt von freien und immobilisierten Zellen dargestellt. Die Abbildung 33 zeigt die Alkaloidgehalte des Mediums.

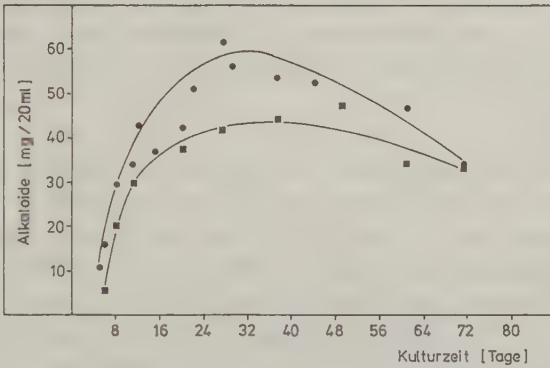


Abb. 32: Alkaloidgehalte von freien und immobilisierten Th.rugosum-Zellen; (2.0 g/20 ml IM II, 18 Tage alt) freie ●—● und immobilisierte ■—■ Zellen.

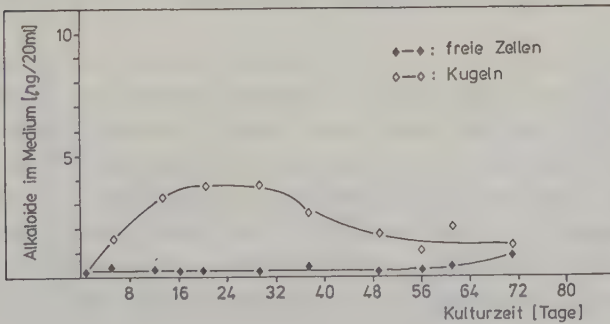


Abb. 33: Alkaloidgehalt des Mediums von freien ◆—◆ und immobilisierten ◇—◇ Th. rugosum-Zellen; (2.0 g/20 ml IM II, 18 Tage alt).

Bei den immobilisierten Zellen war der Alkaloidgehalt im Medium um das 10fache gegenüber den freien Zellen erhöht (Abb. 33). In der Gesamtalkaloidbildung ergab sich kaum ein Unterschied zwischen freien (2.75 g/l) und immobilisierten Zellen (2.4 g/l).

Beide Ansätze waren annähernd im gleichen Umfang zur de-novo Synthese der Alkaloide fähig. Die Gesamtmenge war bei den immobilisierten Zellen, wie es schon für die Cinnamoylputrescine beobachtet wurde, nicht gesteigert. Positiv zu vermerken bleibt das erhöhte Ausscheiden der Alkaloide in das Medium, ca. 10% bei den immobilisierten Zellen, und die hohe Stabilität der Kultur. Die Alkaloidgehalte in den Zellen blieben über einen langen Zeitraum konstant. Erst nach 60 Tagen war eine beginnende Zellyse festzustellen, die Alkaloidgehalte im Medium stiegen an (Abb. 33). Im letzten Kulturabschnitt war ein geringer Abbau der Alkaloide zu bemerken.

3.2.3. Aufnahme und Einbau von markiertem Tyrosin durch freie und immobilisierte Zellen von *Th. rugosum*

Die Alkaloide von *Th. rugosum* gehören zu den Isochinolin-Alkaloiden und werden aus dem Primärstoffwechsel ausgehend vom L-Tyrosin über das L-DOPA gebildet. Die Aufnahmegeschwindigkeit von Tyrosin aus dem Medium ist ein Parameter für die Vitalität der Kultur. Der Einbau in die Alkaloide beschreibt die Aktivität des Sekundärstoffwechsels. So können eventuelle Unterschiede in der Syntheseleistung bei freien und immobilisierten Zellen belegt werden.

In einem ersten Versuch dazu wurde eine Aufnahmekinetik von 1 mM ^{14}C -L-Tyrosin durch freie und immobilisierte *Th. rugosum*-Zellen im Produktionsmedium erstellt (Abb. 35).

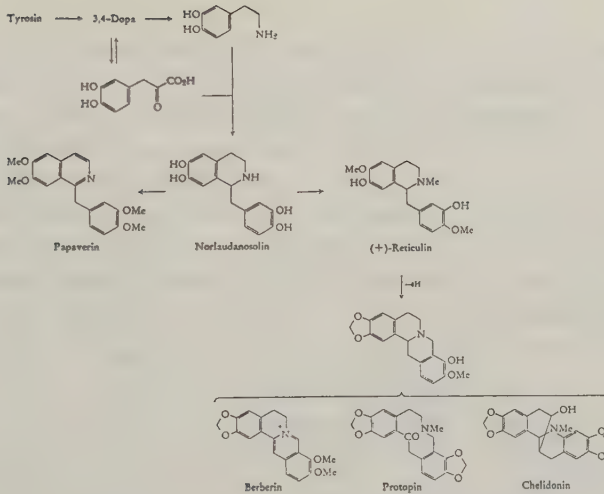


Abb. 34: Syntheseweg der Protoberberin-Alkaloide
(Teuscher 1975)

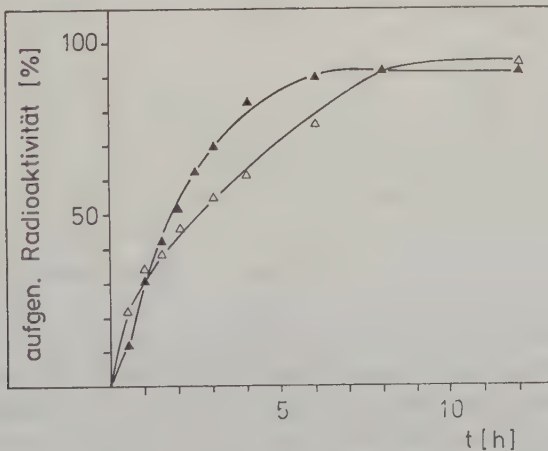


Abb. 35: Aufnahmekinetik von L-Tyrosin durch freie und immobilisierte Th. rugosum-Zellen im Produktionsmedium; 2.0 g/20 ml IM II mit 1 mM L-Tyrosin und 0.5 uCi L-(U-¹⁴C)Tyrosin inkubiert, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ freie und $\triangle$ — $\triangle$ immobilisierte Zellen.

Innerhalb von 6 Stunden waren von beiden Ansätzen 90% des Tyrosins aufgenommen worden. Das entspricht den Ergebnissen aus den Fütterungsversuchen mit Tabakzellen (Abb. 11). Die Aufnahme des Tyrosins durch immobilisierte Th. rugosum-Zellen war leicht verzögert. Im Vergleich zur Tabakkultur konnten recht hohe Mengen an Radioaktivität aus den Zellen und Kugeln (anfänglich 70-50% der aufgenommenen Aktivität) extrahiert werden. Diese war für beide Ansätze annähernd identisch (Abb. 36).

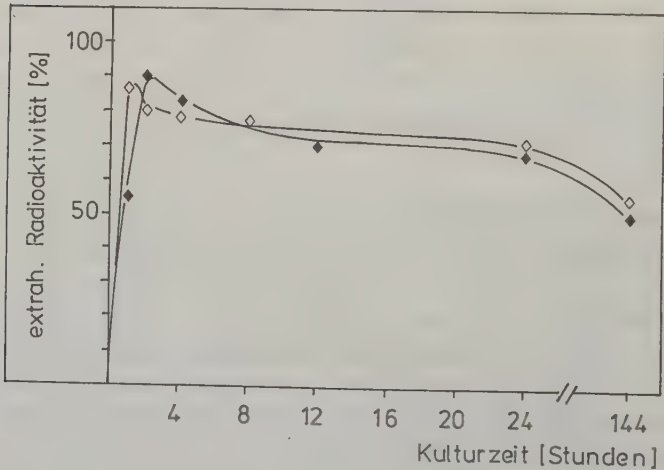


Abb. 36: Extrahierte Radioaktivitätsmenge (%) aus Th. rugosum-Zellen im Produktionsmedium; 2.0 g/20 ml IM II mit 1 mM L-Tyrosin und 0.5 uCi L-(U-¹⁴C) Tyrosin inkubiert, freie $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$ und immobilisierte $\diamond$ — $\diamond$ Zellen.

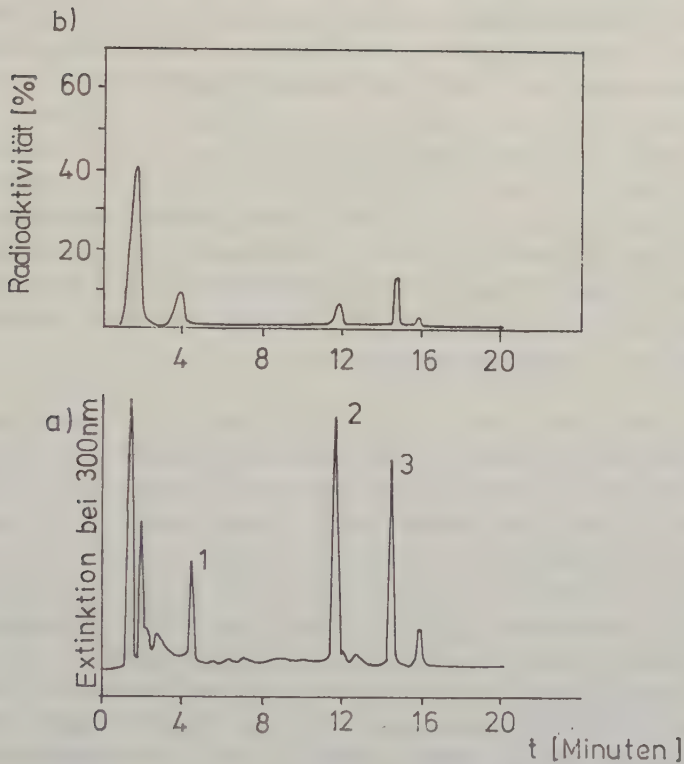


Abb. 37: HPLC-Trennung eines *Th. rugosum*-Zellextraktes; 24 Stunden nach der Fütterung mit 1 mM L-Tyrosin und 0.5 uCi L-(U- 14 C)Tyrosin im IM II-Medium, a) Alkaloide b) Radioaktivitätsverteilung als prozentualer Anteil der Radioaktivität im Zellextrakt. 1. Magnoflorin, 2. Columbamin und 3. Berberin.

Der Einbau des Tyrosins in die Alkaloide wurde durch die Radioaktivitätsmessung des fraktionierten Eluates aus der HPLC-Trennung bestimmt (Abb. 37). Die prozentuale Aufteilung

der Radioaktivität war für freie und immobilisierte Zellen annähernd gleich.

Die Entwicklung der Vitalität und der Aktivität des Sekundärstoffwechsels im Produktionsmedium bei freien und immobilisierten Th. rugosum-Zellen wurde verglichen, indem jeweils 0.5 uCi L-(U-¹⁴C)Tyrosin 5 Tage vor der Probennahme in das Kulturmedium gegeben wurden. Während der gesamten Kulturzeit wurden von den freien und den immobilisierten Zellen 90% der Aktivität aufgenommen. Das bedeutet eine gleich gute Vitalität. Die Tabelle 7 gibt die Radioaktivitätsverteilung zwischen dem Zellextrakt und den Alkaloiden für die freien und immobilisierten Zellen wieder.

Aus den freien Zellen konnte in der Regel ein etwas größerer Teil der Radioaktivität extrahiert und in den Alkaloiden nachgewiesen werden als aus den Kugeln. Insgesamt verhielten sich freie und immobilisierte Zellen hinsichtlich des Einbaus von Tyrosin in die Alkaloide gleich.

Mit zunehmender Kulturzeit war bei gleich guter Aufnahme weniger Aktivität extrahierbar, und der Einbau in die Alkaloide ging zurück. Am Ende der Kulturzeit ging mehr Radioaktivität in den Extraktionsrückstand. Gegen den Einbau in das Protein spricht die Reduzierung des Wachstums im Produktionsmedium und die Tatsache, daß die Proteinbiosynthese gegen Ende einer Kulturzeit eher zurückgeht. Ob durch beginnende Zellyse Tyrosin durch andere "unspezifische" Enzyme (Phenolasen?) verstärkt hydroxyliert wurde und anschließend in den Zellrückstand eingebaut wurde, wurde nicht untersucht.

Tabelle 7: ^{14}C -Radioaktivität (%) im Zellextrakt und den Alkaloiden von freien und immobilisierten *Th. rugosum*-Zellen im IM II-Medium bezogen auf die aufgenommene Aktivitätsmenge; 2.0 g/20 ml IM II 5 Tage vor Probenahme mit 0.5 uCi L-(U- ^{14}C) Tyrosin gefüttert.

^{14}C -Radioaktivität (%)					
Fütterung	Ernte	freie Zellen		Kugeln	
(Tage)	(Tage)	Extrakt	Alkaloide	Extrakt	Alkaloide
5	10	76	35	56	19
29	34	66	19	65	12
44	49	54	3	47	3
71	76	24	—	16	—

Die hier gefundenen Ergebnisse für die Aufnahme und den Einbau von markiertem Tyrosin passen zu den Daten, die unter 3.2. dargestellt sind. Die gute Aufnahme zeigte die lang anhaltende Stabilität der Kultur. Erstaunlich ist, daß dies auch für die freie Zellen galt.

3.2.4. Permeabilisierung von *Th. rugosum*-Zellen

Wie oben dargestellt, wiesen die immobilisierten Zellen einen erhöhten Alkaloidgehalt im Medium auf (Abb. 33). Die verstärkte Abgabe der Produkte könnte auf die Einbettung der Zellen in die Matrix zurückzuführen sein (Lindsey und Yeoman 1984; Lindsey 1985). Allerdings wäre eine 10%ige "natür-

liche" Ausscheidung der Protoberberinalkaloide nicht ausreichend, um einen Prozeß mit immobilisierten Zellen vorteilhaft erscheinen zu lassen. Deshalb sollte geprüft werden, ob eine zusätzliche zellschonende chemische Permeabilisierung den Anteil der Alkaloide im Medium weiter erhöhen könnte.

Bei den Versuchen zur Permeabilisation von Tabakzellen hatte sich 1-Propanol als ein gutes Permeabilisierungsmittel erwiesen. Deshalb wurden in einem ersten Versuch Th. rugosum-Zellen mit verschiedenen 1-Propanolkonzentrationen behandelt, um die Empfindlichkeit der Kultur und die Stabilität der Alkaloide zu untersuchen (Tabelle 8; Abbildung 38).

Tabelle 8: Alkaloidgehalte von mit 1-Propanol permeabilisierten freien Th. rugosum-Zellen 1 und 20 Tage nach der Permeabilisierung; 2.0 g/20 ml IM II.

IM II		Alkaloidgehalt pro Ansatz (mg/20ml)				
mit	nach 1 Tag			nach 20 Tagen		
1-Prop. Medium	Zellextrakt gesamt			Medium Zellextrakt gesamt		
0	0.1	1.9	2.0	Spuren	27.2	27.2
0.5%	0.4	1.6	2.0	0.8	1.4	2.2
1.0%	0.6	1.4	2.0	1.3	0.6	1.9
5.0%	1.6	0.3	1.9	1.5	0.5	2.0

Im Medium des Kontrollansatzes waren 24 Stunden nach dem Überimpfen, 5% der Gesamtalkaloidmenge zu finden. Durch den osmotischen Streß beim Überimpfen vom Wachstumsmedium (anfänglich 3% Saccharose) auf das Produktionsmedium (8%), wurden vermutlich Zellen zerstört, und die Alkaloide gelangten in das Medium. Durch die zusätzliche Permeabilisierung wurde der Anteil der Alkaloidmenge im Medium bei 0.5% 1-Propanol auf 29% gesteigert. Bei 1.0% 1-Propanol wurden nach 24 Stunden 30% und bei 5% 1-Propanol sogar 84% der Alakloide im Medium gefunden. Durch HPLC-Analyse des Zellextraktes unbehandelter Zellen und des Mediums permeabilisierter Zellen wurde gezeigt, daß die Alkaloide durch die Permeabilisierung nicht zerstört wurden. Die Summe der Alkaloidmenge aus Medium und Zellextrakt blieb gleich (Tabelle 8).

Aus der Tabelle 8 und der Abbildung 38 geht aber auch hervor, daß bereits eine 5%ige Propanolkonzentration ausreichte, um die Alkaloidbildung zum Stillstand zu bringen. Die Th. rugosum-Kultur reagierte wesentlich sensibler auf 1-Propanol. Deshalb versuchte ich Dimethylsulfoxid (DMSO), das in der Literatur als erfolgreiches Permeabilisierungsmittel beschrieben wurde (Felix et al. 1981; Felix und Mosbach 1982; Brodelius und Nilsson 1983), als weiteres Agens. Um den behandelten Zellen bessere Voraussetzungen zur Regenerierung zu geben, inkubierte ich sie im Wachstumsmedium, ähnlich wie es von Brodelius und Nilsson (1983) vorgeschlagen wurde. Die Möglichkeit, daß freie Zellen neben den immobilisierten auftreten könnten, nahm ich zugunsten einer Aussage über die Lebensfähig- oder Regenerierbarkeit von permeabilisierten Zellen in Kauf.

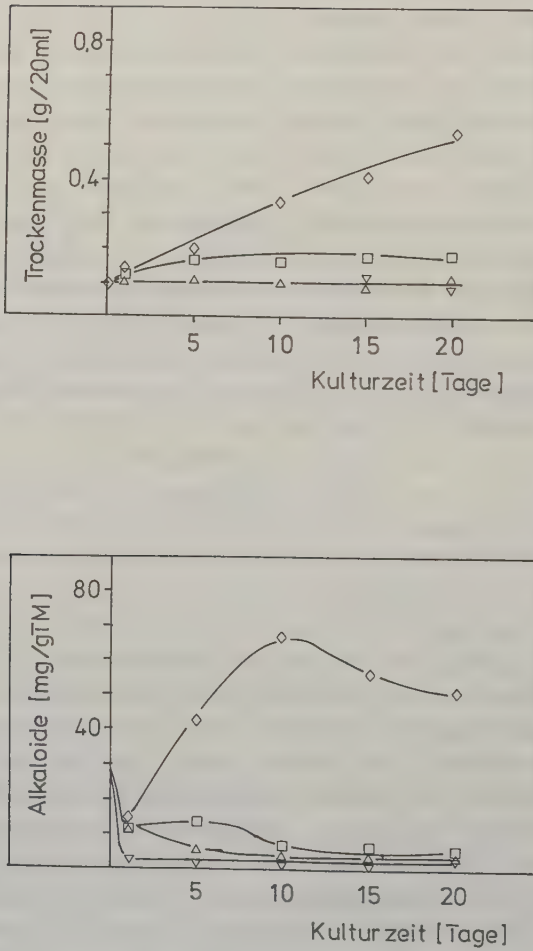


Abb. 38: Entwicklung der Trockenmasse und der spezifischen Alkaloidgehalte von mit 1-Propanol permeabilisierten Th. rugosum-Zellen; 2.0 g/20 ml IM II $\diamond-\diamond$ Kontrolle; $\square-\square$ 0.5%, $\triangle-\triangle$ 1.0% und $\nabla-\nabla$ 5% 1-Propanol.

Permeabilisierung mit DMSO

Angesichts der erhöhten Stabilität der Kultur durch die Einbettung in Ca-Alginat (Abb. 32) wurden die Permeabilisierungsversuche mit DMSO gleich an immobilisierten Zellen durchgeführt.

Die Tabelle 9 gibt zum einen die Gesamtalkaloidmenge in den einzelnen Ansätzen wieder. Zum anderen wird gezeigt, wie sich die Verteilung der Alkaloide auf Medium und Zellen durch die Permeabilisierung verändert.

Tabelle 9: Alkaloidgehalt im Medium und den Kugeln von Th. rugosum Zellen 4.5 Stunden nach der Permeabilisierung; 2.0 g immobilisierte Zellmasse wurde in 20 ml MX-Medium mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen für 30 Minuten permeabilisiert, dann wurden die Kugeln für 4 Stunden in DMSO-freies MX-Medium überführt und extrahiert.

DMSO (%)	Alkaloidgehalt (ug/20ml)			Anteil der freien
	Medium	Zellen	gesamt	Alkaloide (%)

0	64	433	497	13
5	113	433	549	21
10	129	254	383	34
20	315	132	447	70
30	338	100	438	77

Auch ohne Permeabilisierung können nach dem Überimpfen durchaus 10% der Gesamtalkaloidmenge im Medium auftreten. Das Ausmaß dieser Alkaloidabgabe hängt stark vom Zustand (Alter) der Zellen zum Überimpfzeitpunkt ab.

Die Zellen konnten mit DMSO gut permeabilisiert werden. Anhand der Medienfärbung (Berberin und Columbamin sind gelb) war zu ersehen, daß der größte Teil der freien Alkaloidmenge innerhalb der ersten halben Stunde ausgeschieden wurde. Daran, daß die Summe der gefundenen Alkaloidmenge auch bei den mit hohen DMSO-Konzentrationen behandelten Zellen noch gut mit der des Kontrollansatzes übereinstimmte, ist zu ersehen, daß die Alkaloide auch bei dieser Permeabilisierung erhalten blieben.

Das Wachstum und die weitere Alkaloidbildung dieser behandelten immobilisierten Zellen zeigen die Abbildungen 39 und 40.

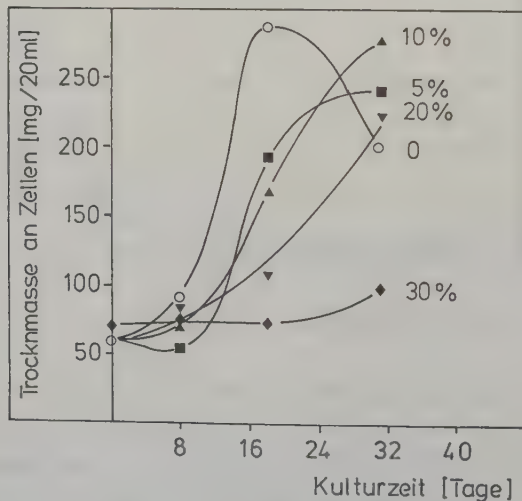


Abb. 39: Trockenmasse an immobilisierten Zellen von Th. rugosum in den Kugeln nach der DMSO-Behandlung; 2.5 g Kugeln in 20 ml MX-Medium.

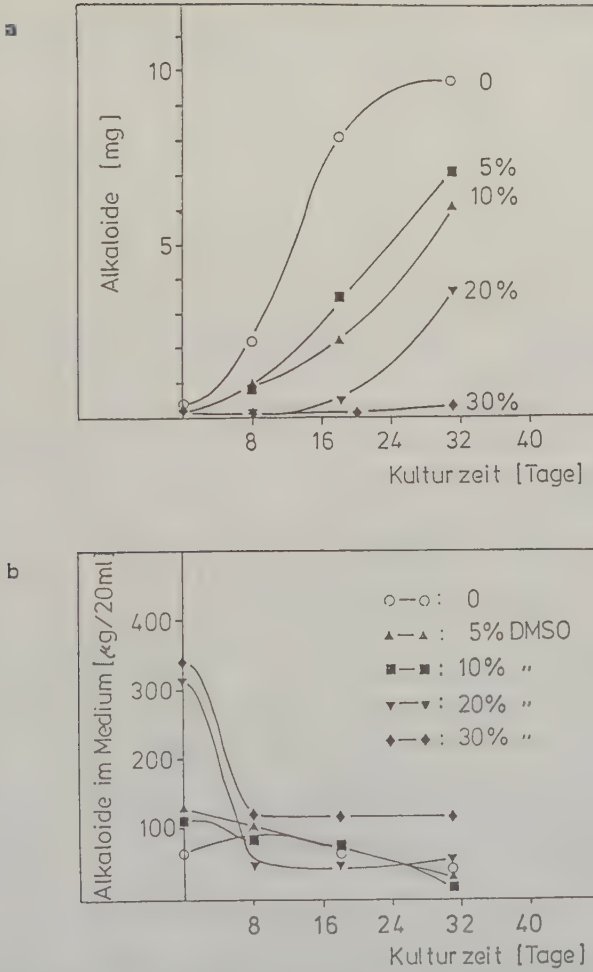


Abb. 40: Alkaloidbildung von immobilisierten *Th. rugosum*-Zellen nach der Permeabilisierung. 2.5 g Kugeln wurden in 20 ml MX-Medium für 30 Minuten mit 5-30% DMSO permeabilisiert. (a) Alkaloidgehalt in den Kugeln und (b) im Medium.

Die Kugeln, die mit 30% DMSO behandelt wurden, bildeten keine Alkaloide mehr. Aus der Abb. 40 geht hervor, daß keine weiteren Alkaloidmengen ausgeschieden wurden. Die neugebildeten Alkaloide blieben in den Zellen. Mit DMSO konnten die immobilisierten Th. rugosum-Zellen gut permeabilisiert werden. Die ausgeschiedenen und die in den Zellen verbliebenen Alkaloide blieben stabil. Das Zellwachstum und die Alkaloidbildung war bei den permeabilisierten Ansätzen zum Teil stark verzögert. Je höher die eingesetzte DMSO-Konzentration war, desto länger war die lag-Phase des Wachstums und der Alkaloidsynthese. Das kann an einer Regenerierungsphase der Zellen gelegen haben. Es kann aber auch, und das halte ich für wahrscheinlicher, an der Zerstörung einiger Zellen liegen, deren Alkaloide dann in das Medium gelangten. Der verbliebene Teil an Zellen, jüngere oder nicht permeabilisierte Zellen, wuchsen wieder an und produzierten Alkaloide. Aufgrund der nach der Permeabilisierung verringerten Zellzahl traten die beobachteten Verzögerungen ein, und deshalb wurden zum Teil geringere Werte gegenüber der Kontrolle erzielt. Beachtenswert bleibt, daß im Gegensatz zu n Propanol mit 20% DMSO 70% der Alkaloide in das Medium abgegeben wurden und, daß eine solche Kultur sich langsam wieder erholen konnte. Allerdings ist die zeitliche Verzögerung im Wachstum und die herabgesetzte Alkaloidsynthese für die Entwicklung eines Prozesses auch hier nicht tragbar.

Zur Beschreibung der Syntheseleistung wurden diese permeabilisierten Zellen 7 Tage vor der Ernte mit L-(U-¹⁴C)Tyrosin gefüttert. Die Aufnahmegeschwindigkeit und der Einbau in die Alkaloide sollte Aufschluß über die Vitalität der Kultur und der Aktivität des Sekundärstoffwechsels geben.

Aufnahme und Einbau von markiertem Tyrosin durch immobilisierte, permeabilisierte *Th. rugosum*-Zellen

Um deutlich zu machen, welche Effekte das Permeabilisierungsagens DMSO auf die Vitalität der Zellen hat, wurden wiederum Einbauversuche mit ^{14}C -markiertem Tyrosin durchgeführt. Es zeigte sich, daß dabei die Aufnahmegeschwindigkeit bei den schwach permeabilisierten Zellen nach dem 1. und 11. Tag verringert war. Nach 24 Tagen hatten sie wieder die gleiche Aufnahmegeschwindigkeit wie die Kontrolle. Die Ansätze, die mit 20% DMSO behandelt wurden, waren stark geschädigt, und die mit 30% permeabilisierten können angesichts der Ergebnisse für Wachstum und Produktion als tot bezeichnet werden.

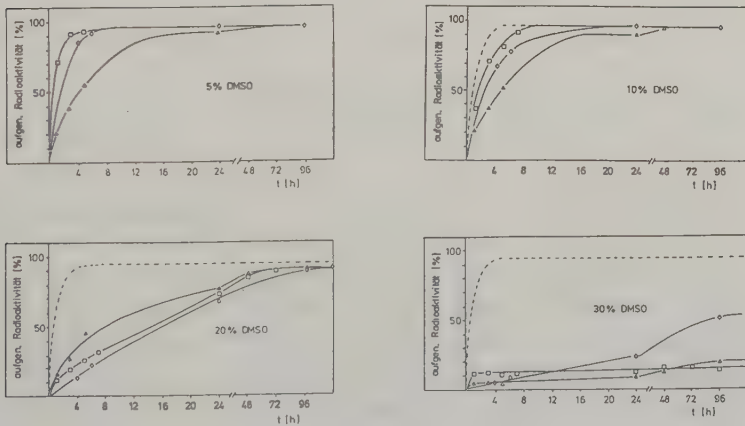


Abb. 41: Aufnahmekinetik von 0.5 uCi L-(U- ^{14}C)Tyrosin durch immobilisierte, permeabilisierte *Th. rugosum* Zellen; Animpfdichte 2.5 g Kugeln/20 ml MX, die mit a) 5%, b) 10%, c) 20% und d) 30% DMSO für 30 Minuten behandelt worden waren. Die Zufütterung erfolgte $\triangle$ — $\triangle$ 1 Tag, $\diamond$ — $\diamond$ 11 Tage und $\square$ — $\square$ 24 Tage nach der Permeabilisierung.

Die Tabelle 9 beschreibt die Radioaktivitätsverteilung zwischen dem Medium, den Zellextrakten und den Alkaloiden. Der Einbau in die Alkaloide wurde aus der Summe der in HPLC-Trennungen gefundenen Radioaktivität in der Berberin-, Columbamin- und Magnoflorin-Fraktion ermittelt.

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität nach Fütterung von markiertem L-Tyrosin an immobilisierte und mit DMSO permeabilisierte (30 Minuten) Th. rugosum-Zellen. Ansatz: 0.5 uCi L-(U-¹⁴C)Tyrosin pro 2.5 g Kugeln in 20 ml MX-Medium. Fütterungszeitpunkt nach Permeabilisierung 1) 1 Tag, 2) 11 Tage und 3) 24 Tage. Nach 7 Tagen wurde die aufgenommene Radioaktivitätsmenge, die Radioaktivität im Zellextrakt und der Einbau in die Alkaloiden bestimmt.

¹⁴ C-Radioaktivität (%)									
DMSO	aufgenommen			Extrakt			Alkaloide		
(%)	1)	2)	3)	1)	2)	3)	1)	2)	3)
0	97	98	96	44	45	45	13	33	12
5	95	97	98	44	41	71	9	27	25
10	96	97	98	35	32	52	6	27	17
20	92	95	95	20	33	53	3	19	18
30	62	40	18	7	10	16	1	4	3

Auch anhand der Radioaktivitätsgehalte im Extrakt und den Alkaloiden ist zu ersehen, daß die behandelten Kulturen

geringere Syntheseleistungen erbrachten. Die Zellen erholten sich jedoch wieder und erreichten verzögert zum Teil die Werte der Kontrolle. Die Ergebnisse für die Ansätze, die mit 30% DMSO behandelt wurden, zeigen, daß noch eine sehr geringe Alkaloidsynthese stattgefunden haben muß.

Die Aussage über die zunehmende Vitalität der Kultur (Abb. 41) und den ansteigenden Einbau von markierten L-Tyrosin in die Alkaloide durch die permeabilisierten Zellen (Tab. 9), entspricht den Ergebnissen für das Wachstum und der Alkaloidbildung (Abb. 39 und 40). Innerhalb der beobachteten Kulturzeit erholten sich die Zellen entsprechend dem Permeabilisierungsgrad unterschiedlich schnell. Der Rückgang der Vitalität der Kultur nach der Permeabilisierung, gemessen an der verzögerten Aufnahme (Abb. 41), scheint mir auch hier eher die Vermutung zu stützen, daß die Zellen durch die Permeabilisierung teilweise extrahiert wurden. Permeabilisierte Zellen sollten noch zu einer guten Aufnahme von Aminosäuren in der Lage sein.

3.2.5. Zusammenfassung

Die immobilisierten Th. rugosum-Zellen waren ebenso, wie bereits für Tabakzellen gezeigt wurde, im annähernd gleichen Umfang wie entsprechende freie Zellen zur de-novo Synthese der Alkaloide im Produktions- und Wachstumsmedium fähig (Abb. 32 und 40). Es trat also auch hier durch die Immobilisierung keine erhöhte Sekundärstoffbildung ein. Die Ergebnisse der Literatur, die die Anwendung der Immobilisierung durch gesteigerte Syntheseaktivität als aussichtsreich erscheinen lassen (Brodelius und Mosbach 1982a, Brodelius und Nilsson 1980, Brodelius und Mosbach 1982b, Lindsey und Yeoman 1984 und Lindsey 1985) lassen sich auf die Tabak- und *Thalictrum*-Kulturen nicht übertragen.

Von den immobilisierten Th. rugosum-Zellen wurde zwar ein erhöhter Anteil der Alkaloide in das Medium abgegeben (Abb. 33), aber diese leichte Erhöhung kann als nicht ausreichend angesehen werden, um die Immobilisierung zu rechtfertigen. Durch zusätzliche Permeabilisierung konnte der Anteil der freien Alkaloide von Th. rugosum-Zellen erhöht werden (Tab. 7 und 8). Die Alkaloide erwiesen sich auch als stabil und somit als aussichtsreicheres Untersuchungsobjekt als es die Cinnamoylputrescine waren. Allerdings war das Wachstum und die Alkaloidbildung nach der Permeabilisierung vor allem bei hoher Ausscheidung zum Teil stark verzögert.

So konnten mit 10% DMSO rund 30% der Alkaloide in das Medium gebracht werden (Tab. 8), das waren nur ungefähr 20% mehr als die unbehandelte immobilisierte Kultur abgab. Das führte jedoch dazu, daß diese Kultur rund 12 Tage im Kulturverlauf gegenüber der Kontrolle verzögert war (Abb. 39 und 40). In diesem Zeitraum hätte man mit einer freisuspendierten Kultur sicher mehr Alkaloide gewinnen können. Die Abgabe der Alkaloide an das Medium und die Verzögerung im Kulturablauf ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Permeabilisierung mit organischen Lösungsmitteln eher eine Extraktion ist als eine Veränderung der Durchlässigkeit von biologischen Membranen. Die Zellen, die dieser "Extraktion" entgangen waren, wuchsen dann weiter und bildeten neue Alkaloide. Da weniger Zellen zur Verfügung standen, mußte das Wachstum konsequenterweise verzögert sein. Ein "Melken" (wiederholtes Permeabilisieren, Regenerieren, Produzieren und Permeabilisieren) der Kultur, wie es von Brodelius und Nilsson (1983) vorgeschlagen wurde, halte ich aufgrund dieser Beobachtungen für Th. rugosum für nicht rentabel.

Nichtsdestotrotz wäre es prinzipiell von großer Bedeutung herauszufinden, ob eine durch chemische Agentien einmal permeabilisierte Zelle wieder zu einer wachsenden, Produkte

speichernden Zelle werden kann. Die von mir geäußerte Vermutung, daß die Regenerierung einer permeabilisierten Zellkultur wahrscheinlich eher durch das Nachwachsen nicht permeabilisierter Zellen als durch deren Reparatur erklärt werden kann, ergab sich aus den zeitlichen Verzögerungen. Um das experimentell nachzuweisen, schien mir das *Thalictrum*-System nicht geeignet zu sein, da trotz der gelblichen Färbung der Protoberberine, die Abgabe der Alkaloide aus der Zelle nach der Permeabilisierung und deren späterer Wiedereinlagerung nicht deutlich genug unter dem Mikroskop zu erkennen war. Deshalb habe ich entsprechende Untersuchungen in dieser Richtung mit einer *Chenopodium rubrum*-Kultur durchgeführt.

3.3. Chenopodium rubrum

3.3.1. Bestimmung der Betacyane aus Chenopodium rubrum

Die Zellen von Chenopodium rubrum bilden im Wachstumsmedium (MX) und im Licht Betalaine, unter denen die Betacyane den Hauptanteil ausmachen (Berlin et al. 1986). Die Zellen sind durch die Betacyane tiefrot gefärbt, und man kann unter dem Mikroskop erkennen, daß die Betacyane in der Vakuole gespeichert sind (Sieg 1983). Bei den nachfolgenden Versuchen wurden die Betacyane als Parameter gewählt, um den Einfluß der Permeabilisierung auf die Ch. rubrum-Zellen zu untersuchen. Die Betacyane können leicht photometrisch bestimmt werden, und man sieht schnell an der roten Farbe, ob Veränderungen bei der Kultur auftreten. Das Absorptionsmaximum der Betacyane liegt bei 538 nm (Abbildung 42). Die freien Betacyane wurden direkt im Medium bestimmt. Aus den Zellen wurden sie mit 50% MeOH mittels Turrax extrahiert.

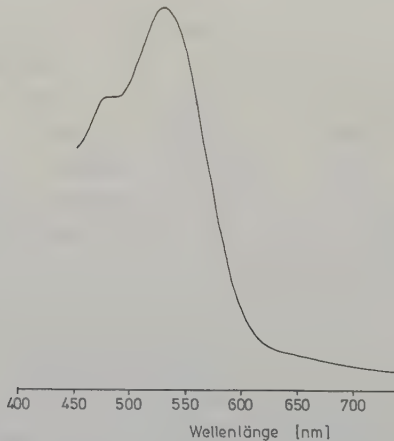


Abb. 42: Absorptionsspektrum der Betacyane.

3.3.2. Permeabilisierung von *Chenopodium rubrum*-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO und 1-Propanol

Zellen von Ch. rubrum wurden für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder 1-Propanol permeabilisiert, um zu erfahren, wie die Relation zwischen ausgeschiedener Betacyanmenge und eingesetztem Permeabilisierungsagens aussieht, und ob die Betacyane durch die Permeabilisierung der Zellen zerstört werden. Die Tabelle 10 gibt die Betacyanmengen wieder, die von den Zellen freigegeben wurden, und deren prozentualen Anteil an der Gesamtbetacyanmenge.

N-Propanol erwies sich als effektiveres Agens in bezug auf die Permeabilisierung. Bereits bei 10% 1-Propanol wurden über 80% der Betacyane im Medium gefunden, und eine Steigerung der Konzentration erbrachte keine weitere Erhöhung mehr. Mit 20% DMSO wurde der maximale Betacyangehalt im Medium mit rund 60% erzielt. Eine 5%ige Konzentration erzielte für DMSO 13% und für 1-Propanol 7% an freien Betacyanen im Medium. Mehr als 5% Permeabilisierungsagens mußten auf jeden Fall eingesetzt werden, um den größten Teil der Betacyane ins Medium zu bringen.

Die abgegebenen Betacyane blieben im abgetrennten Medium über 1-2 Tage stabil. Die Zellen verloren im Anschluß an die Permeabilisierung binnen kurzer Zeit ihre noch leicht rötliche Färbung, und es waren keine Betacyane mehr extrahierbar. Bei den mit entsprechenden DMSO-Konzentrationen permeabilisierten Zellen trat die Entfärbung der Zellen (ca. 40%), die nach der Permeabilisation noch rot waren, erst nach einem Tag ein. Das deutet darauf hin, daß die Restmenge an Betacyan in diesen permeabilisierten Zellen abgebaut wurde. Die Zellen, die mit 1 und 5% DMSO permeabilisiert wurden, hatten ihre rote Farbe behalten.

Eine ausreichende Permeabilisierung der Kultur, die ein hohes Maß an Betacyanabgabe erbrachte, schädigte die Zellen vermutlich in der Form, daß die in den Zellen verbliebene Betacyanmenge zeitlich verzögert abgebaut wurde.

Tabelle 10: Freigesetzte Betacyanmengen aus Ch.rubrum-Zellen (1.0 g Zellen in 20 ml MX) durch 30 minütige Permeabilisation mit verschiedenen DMSO- und 1-Propanolkonzentrationen; sofort nach der Behandlung photometrisch bestimmt.

	DMSO		1-Propanol	
	E _{538 nm}	(%)	E _{538 nm}	(%)
Kontrolle	0.396	1	0.270	1
1%	0.210	1	0.623	2
5%	4.508	13	2.315	7
10%	19.300	54	27.821	87
20%	22.773	63	26.230	82
30%	22.291	62	26.849	84

3.3.3. Permeabilisierung von immobilisierten Ch. rubrum-Zellen

Immobilisierte Zellen sollten eine Permeabilisierung besser überstehen, d.h. eher zur weiteren Biosyntheseaktivität fähig sein als freie Zellen. Aufbauend auf den Ergebnissen,

die bei der Permeabilisierung freier Ch. rubrum-Zellen erzielt wurden (3.3.2.) und der Vermutung, daß auch hier bei den immobilisierten Zellen höhere Konzentrationen an Permeabilisierungsagentien eingesetzt werden müssen, um das gleiche Maß an Produktabgabe wie bei freien Zellen zu erzielen, wurden die immobilisierten Zellen mit 10 und 20% DMSO oder 1-Propanol behandelt.

In Ca-Alginat immobilisierte Ch. rubrum-Zellen wurden für 30 Minuten permeabilisiert. Die freigegebene Betacyanmenge wurde wieder photometrisch bestimmt und prozentual zur Gesamtmenge ins Verhältnis gesetzt (Tabelle 12).

Die Konzentrationen für das 1-Propanol waren zu hoch gewählt, bereits mit 10% wurden über 90% der Betacyane freigegeben. Das war sogar etwas mehr als beim vergleichbaren Ansatz mit freien Zellen. Die Zellen in den Kugeln waren anschließend farblos. Die Ergebnisse, die mit DMSO behandelten Kugeln erzielt wurden, entsprachen eher den Erwartungen. Die Permeabilisierung mit 10% DMSO erbrachte 15% freie Betacyane, das entspricht dem Ergebnis mit 5% DMSO bei den freien Zellen. In diesem Fall behielten die Zellen in den Kugeln ihre rote Farbe. Der Einsatz von 20% DMSO bei den immobilisierten Zellen erzielte die Freigabe von rund 40% der Betacyane an das Medium. Diese Zellen verloren jedoch im Laufe mehrerer Tage ihre Farbe.

Das DMSO scheint auch bei den immobilisierten Ch. rugrum-Zellen das geeignetere Agens zu sein und eine Konzentration von 10% aussichtsreich, was die verbleibende Syntheseaktivität der Zellen angeht.

Tabelle 12: Freigesetzte Betacyanmenge aus immobilisierten Ch. rubrum-Zellen (1.0 g Zellen/ 20 ml MX), die für 30 Minuten mit 10 oder 20% DMSO oder 1-Propanol permeabilisiert wurden. Die Betacyane wurden im Anschluß an die Permeabilisation photometrisch bestimmt.

	$E_{538 \text{ nm}}$	(%)
Kontrolle	0.3	1
10% DMSO	3.5	15
20% DMSO	8.9	38
10% 1-Prop.	22.9	98
20% 1-Prop.	22.0	94

3.3.4. Wachstums- und Produktionskinetik von permeabilisierten *Chenopodium rubrum*-Zellen

Die Ergebnisse der Permeabilisierungsversuche freier Ch. rubrum-Zellen (3.3.2.) haben gezeigt, daß bei Konzentrationen von 10% und mehr an DMSO oder 1-Propanol, die Zellen sofort oder im weiteren Kulturverlauf farblos wurden. In diesem Versuch soll geklärt werden, ob die Zellen im Anschluß an die Permeabilisierung nach längerer Inkubation im Wachstumsmedium wieder in der Lage sind, weiter zu wachsen und Betacyane zu bilden.

Es wurden 4.0 g Frischmasse von 10 Tage alten Ch. rubrum-Zellen mit 10% DMSO oder 1-Propanol für 30 Minuten permeabilisiert, gespült und auf 4 Kolben mit je 20 ml Wachstumsmedium aufgeteilt und inkubiert. Die Tabelle 13 gibt die ausgeschiedenen Betacyanmengen wieder.

Tabelle 13: Ausgeschiedene Betacyanmengen von Ch. rubrum-Zellen (1.0 g Zellen/20 ml MX), die 30 Minuten lang mit 10% DMSO oder 1-Propanol permeabilisiert wurden. Die Betacyane wurden sofort nach der Permeabilisation im Medium photometrisch bestimmt.

	Betacyane	
	$E_{538 \text{ nm}}$	(%)
Kontrolle	3.31	3
10% DMSO	50.46	47
10% 1-Pop.	106.40	86

Aus den unbehandelten Zellen wurde eine Betacyanmenge von $E_{538 \text{ nm}} = 123.8$ extahiert und als 100% gesetzt.

In der Tabelle 14 sind die Zellmassen und Betacyangehalte der weiter kultivierten Zellen pro Ansatz wiedergegeben.

Im Kulturmedium waren fast keine Betacyane während der Kulturzeit zu finden. Die behandelten Zellen hatten erheblich an Masse verloren und erholten sich im weiteren nicht mehr. Es fand nur eine sehr geringe Zunahme der Zellmasse der mit DMSO behandelten Zellen statt, die im Vergleich zur Kontrolle jedoch unerheblich ist. Die Betacyane wurden nicht mehr

gebildet. Diese Permeabilisierung war im Grunde eine Extraktion der Zellen.

Tabelle 14: Zellmasse und Betacyangehalte von mit 10% DMSO oder 1-Propanol für 30 Minuten permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen (1.0 g Zellen /20 ml MX).

Zeit (Tage)	Kontrolle		DMSO		1-Propanol	
	TM (g)	Betacyane (E _{538 nm})	TM (g)	Betacyane (E _{538 nm})	TM (g)	Betacyane (E _{538 nm})
0	0.050	31.0	-	-	-	-
11	0.205	65.0	0.032	1.0	0.030	0
15	0.235	93.0	0.032	0	0.024	0
28	-	-	0.047	0.3	0.025	0.005

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob Zellen, die mit geringen Konzentrationen an Permeabilisierungsmittel behandelt wurden, weiter wachsen und produzieren können.

Die Abbildung 43 gibt die Wachstumskinetik dieser Zellen wieder. Nur die Zellen, die mit 5% DMSO permeabilisiert worden waren, waren zu weiterem Wachstum in der Lage. Hierbei trat nur eine geringe Verzögerung von 2 Tagen ein. Bei höheren DMSO-Konzentrationen und allen Ansätzen, die mit 1-Propanol behandelt worden waren, fand kein Wachstum mehr statt.

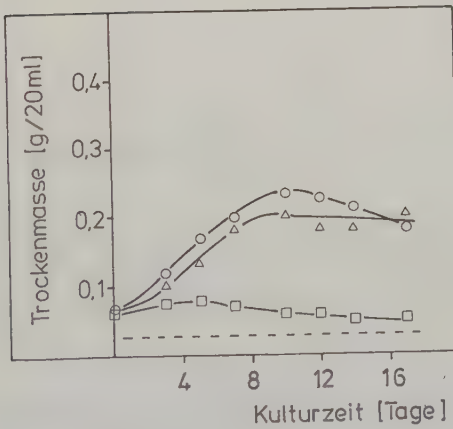
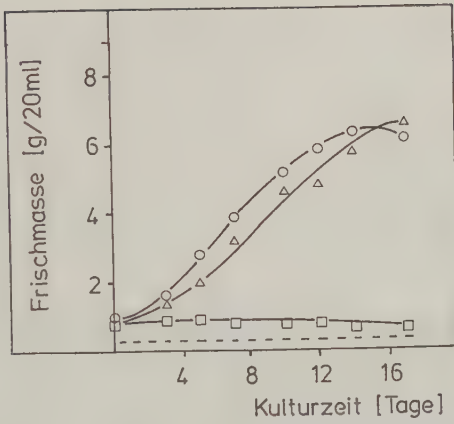


Abb. 43: Wachstumskinetik von mit 5% DMSO oder 1-Propanol für 30 Minuten permeabilisierten, dann abgesaugten Ch. rubrum-Zellen (1.0 g Zellen/20 ml MX): Kontrolle ○—○ , 5% DMSO △—△ , 5% 1-Propanol □—□ und mehr als 5% --- .

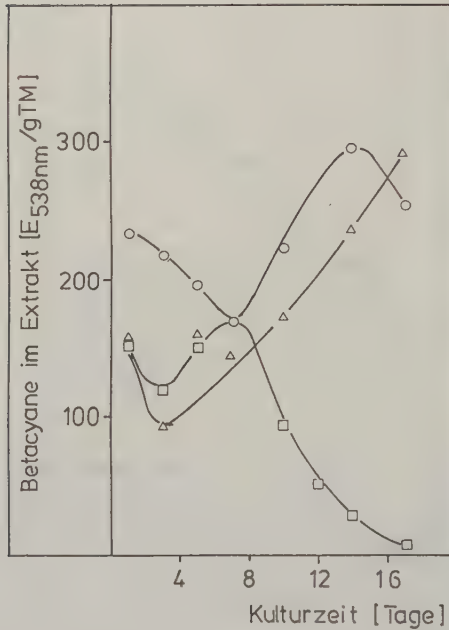


Abb. 44: Betacyangehalte von mit 5% DMSO $\triangle$ — $\triangle$ oder 1-Propanol $\square$ — $\square$ für 30 Minuten permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen (1.0 g Zellen/20 ml MX); Kontrolle $\circ$ — $\circ$.

An den spezifischen Betacyangehalten (Abb. 44) wird deutlich, daß mit dem Wachstum auch die Synthese der Betacyane bei den entsprechenden Ansätzen eingestellt wurde. Die spezifischen Betacyanbildung der mit 5% DMSO permeabilisierten Zellen war zeitlich wesentlich stärker verzögert als das Wachstum. Die Permeabilisierung hat sich wesentlich negativer auf die Betacyanbildung als auf das Wachstum ausgewirkt.

Propanol hat sich zwar als sehr gutes Permeabilisierungsmittel erwiesen, aber die derart permeabilisierten Zellen

waren zu stark geschädigt worden. Sie wuchsen nicht mehr und produzierten keine Betacyane. Nur die Permeabilisation mit geringen DMSO-Konzentrationen scheint in Bezug auf Wachstum und Betacyanbildung erfolgreich zu sein. Dabei wurde nur ein geringe Menge an Betacyanen ausgeschieden, die für eine technologische Nutzung der Permeabilisierung zu gering ist, aber an diesem System soll in erster Linie die Regenerierbarkeit von permeabilisierten Zellen überprüft werden.

3.3.5 Wachstums- und Produktionskinetik von immobilisierten und permeabilisierten *Chenopodium rubrum*-Zellen

Die Betacyane werden von Ch. rubrum-Zellen während der Wachstumsphase gebildet. Von daher müssen auch immobilisierte Zellen in einem Wachstumsmedium inkubiert werden, wenn man diese Verbindungen gewinnen will. Es wurden auch immobilisierte Zellen permeabilisiert und weiter im Wachstumsmedium inkubiert, um zu sehen, ob sich die Zellen in diesem Zustand schneller von den Folgen der Permeabilisierung erholen. Die Abbildung 45 zeigt die Entwicklung der Trockenmasse in den Kugeln an. Das Wachstum der Zellen in den Kugeln war nicht so stark, daß freie Zellen im Medium vorlagen und die Kugeln platzten. Die Kugeln waren zu Beginn zu einem Drittel mit Zellen beladen. Die Zellen hatten den verbliebenen Raum genutzt und auch die Kugeloberfläche bewachsen.

Wie es bereits bei den freien Zellen der Fall war, verlief die Kurve der Trockenmasse der mit DMSO behandelten Zellen ziemlich ähnlich zu der der unbehandelten Zellen. Es trat eine zeitliche Verschiebung auf, und die absoluten Werte lagen etwas niedriger. Die mit 1-Propanol permeabilisierten Ansätze hatten einen drastischen Rückgang der Kugelmasse, woraus man schließen kann, daß die Zellen zerstört wurden. Dafür spricht auch der Verlauf der Betacyangehalte in diesen Ansätzen (Abb. 46).

Bei den mit DMSO behandelten Kugeln trat wiederum eine Verzögerung der Betacyanbildung ein, die deutlicher war, als es beim Wachstum der Fall war.

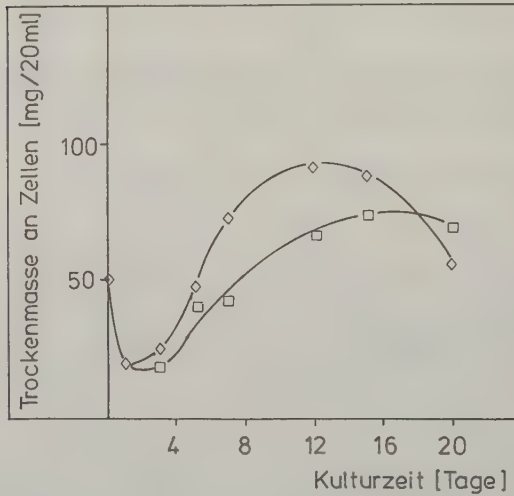


Abb. 45: Zellmasse in den Kugeln von unbehandelten $\diamond-\diamond$ und mit 10% DMSO $\square-\square$ für 30 Minuten permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen (1.0g Zellen/20 ml MX).

Die immobilisierten Ch. rubrum-Zellen wuchsen nicht in dem Umfang, wie es nach dem Wachstumsverhalten der freien Zellen zu erwarten war. Es waren auch unter diesen Bedingungen nur die mit DMSO permeabilisierten Zellen in der Lage, weiter zu wachsen und neue Betacyane zu bilden.

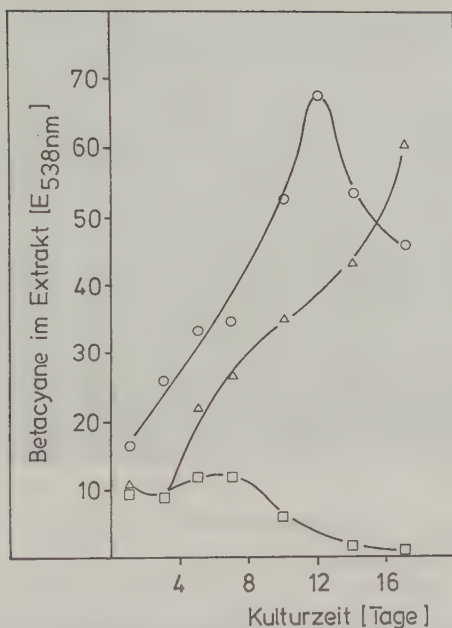


Abb. 46: Betacyangehalte von Ch. rubrum-Zellen ; Kontrolle ○—○ , mit 5% DMSO △—△ und mit 5% 1-Propanol für 30 Minuten permeabilisiert (1.0g Zellen/20 ml MX). □—□ 1.0 g/FM in 20 ml MX.

3.3.6. Untersuchungen zur Regenerierbarkeit von permeabilisierten Ch. rubrum-Zellen

Produzierende Ch. rubrum-Zellen sind rot gefärbt (Abb. 47). Permeabilisierte Zellen verlieren ihre Farbe (Abb. 48), dabei war zu beobachten, daß eine permeabilisierte Zelle alles abgab. Das bedeutet, daß die nicht ausgeschiedenen Mengen an Betacyanen bei permeabilisierten Kulturen in intakten Zellen lokalisiert waren.

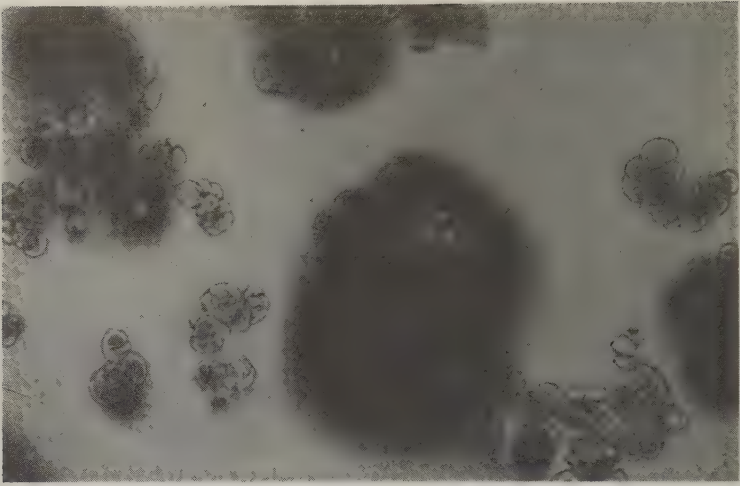


Abb. 47: Chenopodium rubrum-Zellen (produzierende Zellen sind rot gefärbt); Vergrößerung 73fach.

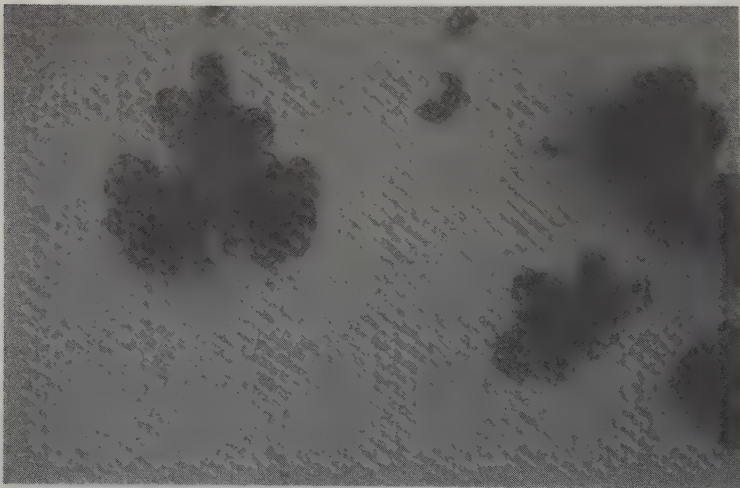


Abb. 48: Permeabilisierte Chenopodium rubrum-Zellen; Vergrößerung 73fach.

Der Permeabilisierungsgrad gibt also Aufschluß darüber, wie groß der Anteil der permeabilisierten Zellen an der Gesamtpopulation ist. Diese Zellen werden auch, sofern ihre Anzahl nicht zu gering ist, weiter wachsen und produzieren können. Ob sich die Zellen, die ihre Inhaltsstoffe abgegeben hatten, wieder regenerieren können, sollte durch Plattierung von permeabilisierten Zellen auf MX-Agar festgestellt werden.

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurden die Kulturen mit 5 und 10% DMSO permeabilisiert, verdünnt und ausplattiert. Es wurde eine dünne Zellsuspension auf die Platten gebracht, um Zellen lokalisieren und ihre Entwicklung mikroskopisch verfolgen zu können. Leider stellte sich heraus, daß die Vereinzellung der Zellen zu stark war, und auch die unbehandelten Zellen nicht anwuchsen und auch ihre Farbe verloren.

Plattierungen von größeren Zellmassen führten zum Wachstum der Zellen auf dem Agar, erlaubten aber nicht mehr die Beobachtung von einzelnen Zellen. Mit permeabilisierten Ch.-rubrum-Zellen wurden dann auf den Platten die gleichen Beobachtungen gemacht, wie mit den behandelten Suspensionskulturen. Allerdings war zu erkennen, daß Zellen, die ihre rote Farbe nach der Permeabilisierung behalten hatten, sich im Inneren von größeren Zellaggregaten befanden. Durch den Schutz der äußeren Zellen wurden sie bei den niedrigen DMSO-Konzentrationen (5-10%) nicht permeabilisiert. Diese Zellen wuchsen dann auch auf der Platte zu produzierenden Callis heran.

3.3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Permeabilisierung der Ch. rubrum-Zellen mit 1-Propanol hat zwar gute Ergebnisse in bezug auf die freigesetzten Betacyanmengen erbracht, jedoch waren diese behandelten Zellen anschließend nicht mehr in der Lage, zu wachsen und

neue Betacyane zu bilden. Das Betacyan, das nicht ausgeschleust wurde, wurde in den Zellen abgebaut.

Die Ergebnisse mit DMSO als Permeabilisierungsmittel haben gezeigt, daß mit Konzentrationen ab 10% für freie und ab 20% für immobilisierte Zellen der gleiche Sachverhalt eintrat, wie er oben für 1-Propanol behandelte Zellen beschrieben wurde.

Mit den geringeren Konzentration von DMSO, 5% bei den freien und 10% bei den immobilisierten Zellen, wurden ungefähr 15% der Betacyane ausgeschleust, aber auch rund 20% in den Zellen abgebaut. Diese Kulturen wuchsen zwar wieder an und waren zur Betacyanbildung fähig, aber erst nach einer längeren lag-Phase. Die geringe Freisetzung der Betacyane, ihr Abbau in den Zellen und die längere Anlaufphase der behandelten Kultur, lassen die Permeabilisierung als nicht rentabel erscheinen.

Die Immobilisierung der Ch. rubrum-Zellen hat in diesem Zusammenhang keinen Vorteil gegenüber den freien Zellen erbracht. Sie reagierten ebenso negativ auf 1-Propanol und hohe DMSO-Konzentrationen. Bei der geringeren DMSO-Konzentration blieben sie mit den absoluten Werten für das Wachstum und die Betacyangehalte deutlich hinter den Ergebnissen der freien Zellen. Das kann an der Förderung der Betacyanbildung durch Licht gelegen haben, die wahrscheinlich bei den immobilisierten Zellen vermindert war. Das würde dann gegen eine Anwendung der Immobilisierung bei photo- oder photomixotrophen Kulturen sprechen.

Die Regenerierbarkeit der permeabilisierten Zellen konnte aus den oben aufgeführten Gründen nicht bewiesen werden. Die Beobachtungen deuten aber darauf hin, daß nur Zellen weiter wuchsen und produzierten, die von der Permeabilisierung verschont geblieben waren.

3.4. Differenzierte Zellen.

Aus den bisher untersuchten Systemen ging klar hervor, daß die Immobilisierung die Biosyntheseleistung zwar nicht steigern konnte, daß aber die Syntheseleistung über einen längeren Zeitraum zu erhalten war. Da in Zellkulturen manche Biosynthesen nur sehr schwach oder gar nicht ablaufen, erscheint es sinnvoll, zu überlegen, ob man nicht auch differenzierte Zellen einer Pflanze, die in der Zellkultur fehlende Biosynthese durchführen kann, immobilisiert und als Produzenten nutzt. Wenn durch die Permeabilisierung der differenzierten Zellen eine interessante Biosyntheseleistung über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten bliebe, ließe sich das System möglicherweise biotechnologisch nutzen.

Ich habe für diese Problematik die Chinolizidin-Alkaloid-Bildung in Lupinen ausgewählt. Die Zellkulturen (auch grüne) produzieren fast keine Chinolizidin-Alkaloide (Wink et al. 1980; Wink und Hartmann 1980a), aber die Blätter sind dazu in der Lage (Wink und Hartmann 1980b). Die Biosynthese scheint in den Chloroplasten abzulaufen (Hartmann et al. 1980; Wink und Hartmann 1980b; Wink und Hartmann 1982). Deshalb habe ich Mesophyllzellen von Lupinus polyphyllus ausgewählt, um die Immobilisierung an differenzierten Zellen zu erproben.

3.4.1. Präparation der Mesophyllzellen

Das Pflanzenmaterial wurde unter unsterilen Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Die Blätter wurden mit Ethanol und einer Hypochloritlösung oberflächensterilisiert. Eine zu intensive Behandlung der Blätter mit diesen Lösungen führte zu Schädigungen der Blätter. Sie begannen, sich braun zu färben. Verweilzeiten von 1 Minute in Ethanol und bis zu 15 Minuten in einer 20%igen Hypochloritlösung schädigten die

Blätter nicht, garantierten jedoch nicht immer vollständige Sterilisation des Blattmaterials. Für die Präparation der immobilisierten Mesophyllzellen war zwangsläufig der Einsatz größerer Blattmengen erforderlich, die aus einem oder mehreren Sterilisationsansätzen genommen wurden. Alternativ hätte das Blattmaterial aus der sterilen Anzucht von Pflanzen gewonnen werden können. Bei größeren Blattmengen ist das aber auch mit einem recht großen Aufwand verbunden.

Von den Blättern wurde die Mittelrippe und die untere Epidermis entfernt. Sie wurden dann in Streifen geschnitten und in den verschiedenen Plasmolyselösungen inkubiert. Aus 6.0 g Blättern konnten nur ungefähr 2×10^8 Mesophyllzellen isoliert werden (Abbildung 49). Dazu waren 0.5 g Macerozym nötig. Die Zellmenge reichte gerade für wenige kleine Versuchsansätze aus. Hieraus wird deutlich, welche große Menge an Blattmaterial nötig ist, und welcher Aufwand dafür betrieben werden muß, um zu Zellmassen zu gelangen, mit denen im technischen Maßstab gearbeitet werden könnte.



Abb. 49: Mesophyllzellen von Lupinus polyphyllus, Vergrößerung 73fach.

3.4.2. Biosyntheseleistung der Blätter und Mesophyllzellen

Der Syntheseweg der Chinolizidin-Alkaloide (Abb. 50) zeigt, daß Lysin und Cadaverin Vorstufen der Alkaloide sind. Anhand der Aufnahme und des Einbaus kann die Biosyntheseaktivität der Mesophyllzellen festgestellt werden. Als Kontrolle dienten Blattstücke, um den Einfluß der Präparation auf die Syntheseleistung zu überprüfen.

Hierzu wurden jeweils 0.5 uCi einer Vorstufe zu den einzelnen Ansätzen, 6×10^7 Mesophyllzellen in Ca-Alginat (5.0 g Kugeln), 0.5 g Blattstücke oder 5.0 g Alginatkugeln in 20 ml Mesophyllmedium (MES) gegeben. Die Aufnahmekinetik für diese Substanzen ist in der Abbildung 51 wiedergegeben.

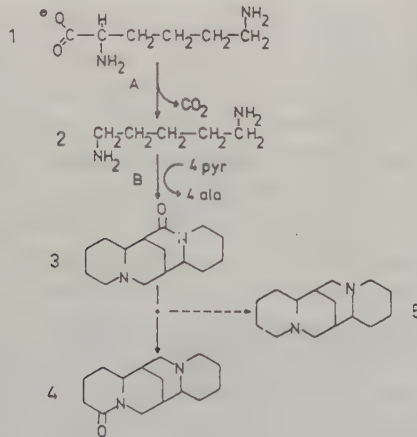
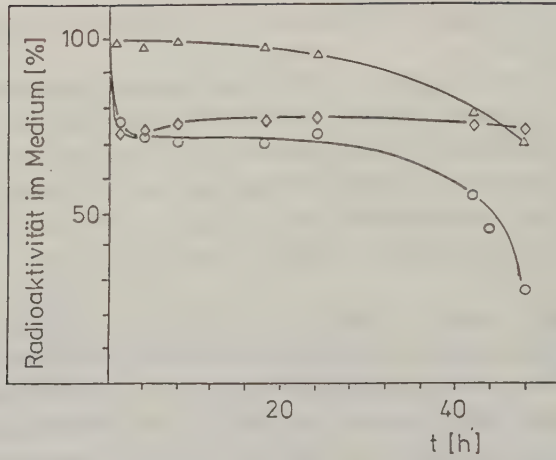


Abb. 50: Biosyntheseweg von Lupanin und Spartein in Lupinus polyphyllus Chloroplasten: 1. Lysin, 2. Cadaverin, 3. 17-oxo-Sparteïn, 4. Lupanin, 5. Sparteïn; A) Lysindecaboxylase und B) 17-Oxosparteïnsynthase. (Hartmann et al 1980)

a



b

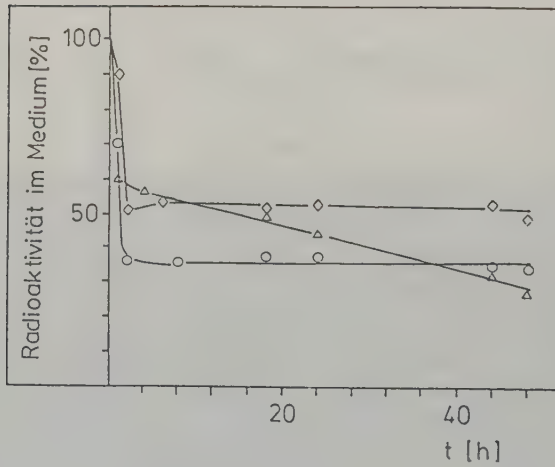


Abb. 51: Aufnahmekinetik von 0.5 uCi a) L-(U-¹⁴C)Lysin und b) L-(1,5-¹⁴C)Cadaverin durch immobilisierte Mesophyllzellen ($6 \cdot 10^7$ Zellen in 5.0 g Kugeln) ○—○, 0.5 g Blattstücke △—△ und 5.0 g Alginatekugeln in 20 ml MES-Medium ◇—◇.

Vergleicht man die Aufnahmegeschwindigkeit der differenzierten Zellen mit der, die in dieser Arbeit für die beschriebenen Zellsuspensionkulturen erzielt wurde, so muß man davon ausgehen, daß die Blattzellen metabolisch weniger aktiv waren. Das gilt auch für die Blattstücke, die nicht dem enzymatischen Verdau ausgesetzt waren. Der Vergleich Alginatkugeln mit immobilisierten Zellen zeigt, daß ein großer Teil der Vorstufen an das Alginat gebunden wurde. Die überaus starke Bindung von Substraten an die Matrix Alginat könnte ein Grund sein, andere Immobilisierungsmaterialien zu testen. Amine scheinen auf jeden Fall problematische Substrate für eine Alginat Matrix zu sein. Erst nach 24 Stunden fand eine nennenswerte "Aufnahme" statt, die aber vermutlich auf eine heranwachsende Infektion zurückzuführen war. Die Ansätze mit Mesophyllzellen oder Blättern waren nach 48 Stunden infiziert.

Nach 24 Stunden, einem Zeitpunkt zu dem die Zellkulturen die Aufnahme längst beendet hatten, und ein Einbau erfolgt war, wurden Proben aufgearbeitet. Zu dieser Zeit dürfte der Einfluß der Infektion noch nicht so entscheidend gewesen sein. Die Tabelle 14 enthält die Radioaktivitätsmengen im 70% EtOH-Zellextrakt und der Alkaloidphase.

Es konnte nur ein sehr geringer Teil der Radioaktivität aus den Kugeln extrahiert werden, wenn man bedenkt, daß z.B. knapp 50% des Cadaverins aufgenommen wurden. Hier hat anscheinend eine wesentlich stärkere Bindung an das Alginat stattgefunden als bei den anderen Versuchen. Aber auch bei den Blattstücken ging der größte Teil der Radioaktivität verloren. Beim Lysin war dieser Anteil geringer. In der Alkaloidphase waren nur bei den mit Cadaverin gefütterten Ansätzen geringe Radioaktivitätsmengen festzustellen.

Tabelle 14: Radioaktivitätsverteilung zwischen dem EtOH-Extrakt und der Alkaloidphase (alk. Ethylacetatextrakt) von immobilisierten Mesophyllzellen und Blattstücken von L. polyphyllus und Alginatkugeln als Kontrolle; 6×10^7 Mesophyllzellen in Ca-Alginat, 0.5 g Blattstücke und 5.0 g Alginatkugeln pro 20 ml MES mit 0.5 μCi L-(U- ^{14}C)Lysin oder L-(1,5- ^{14}C)Cadaverin gefüttert und nach 24 Stunden aufgearbeitet.

Radioaktivität (%)		
	EtOH-Extrakt	Alkaloidphase
für Cadaverin:		
immob. Mesophyllz.	4	0.08
Alginat Kugeln	4	-
Blattstücke	12	0.34
für Lysin:		
immob. Mesophyllz.	10	-
Alginat Kugeln	6	-
Blattstücke	2	-

An mehreren Präparationen von Mesophyllzellen und Blattstücken wurden diese Fütterungsversuche wiederholt, aber die Aufnahme und die Aktivitätsmenge in der Alkaloidphase war immer gleich gering. Um eventuell einen besseren Zeitpunkt für die Aufnahme zu finden, wurden Blätter unterschiedlichen

Alters gefüttert. Es wurde auch geprüft, ob durch die Wundinduktion (Verletzen der Blätter) Wink et al. (1983) die spezifische Syntheserate der Alkaloide und die Einbauraten in den Blättern gesteigert werden kann. Dazu wurden von jungen und älteren Blättern von L. polyphyllus-Pflanzen jeweils 1.0 g Frischmasse an Blättern in 10 ml MES-Medium inkubiert. Ein Ansatz von jeder Serie wurde zu verschiedenen Zeiten ($t=0, 2, 4, 8$ und 21 Stunden) mit 0.5 mg L-Cadaverin und 9 mg Pyruvat, sowie mit 0.5 uCi markierten Cadavarin gefüttert. Nach 24 Stunden wurden die Ansätze geerntet, die Aufnahme der Radioaktivität bestimmt (Tabelle 15), und die Extrakte wurden mittels GC-Messung auf die Alkaloide untersucht (Abb. 52).

Tabelle 15: Radioaktivitätsverteilung in Blattstücken von L. polyphyllus 24 Stunden nach der Fütterung mit mit L-Cadaverin; 1.0 g FM/10 ml MES mit 0.5 uCi L-(1,5-¹⁴C)Cadaverin.

Blattstücke	Radioaktivität (%)	
	EtOH-Extrakt	Alkaloidphase
jung	6.9	0.13
alt	6.7	0.12

Die Radioaktivitätsverteilung zeigt klar, daß es während des gewählten Zeitraumes keine Unterschiede in der Syntheseleistung zwischen jungen und alten Blättern zu geben scheint. Die absoluten Werte sind niedriger als die entsprechenden in

der Tabelle 14, aber in diesem Fall wurde auch kaltes Cadaverin gefüttert, und das erklärt die geringere Aufnahme der Radioaktivität.

Die GC-Messungen der Extrakte (Abbildung 52) zeigt, daß die gefütterten Ansätze keine erhöhten Gehalte an Spartein, Lupanin und 4-HO-Lupanin enthielten. Eine signifikanter Unterschied in den Alkaloidgehalten von jungen und alten Blattstücken war nicht festzustellen, und zusammen mit den Ergebnissen aus der Tabelle 15 ergibt sich keine Abhängigkeit der Alkaloidsynthese vom Alter der Zellen.

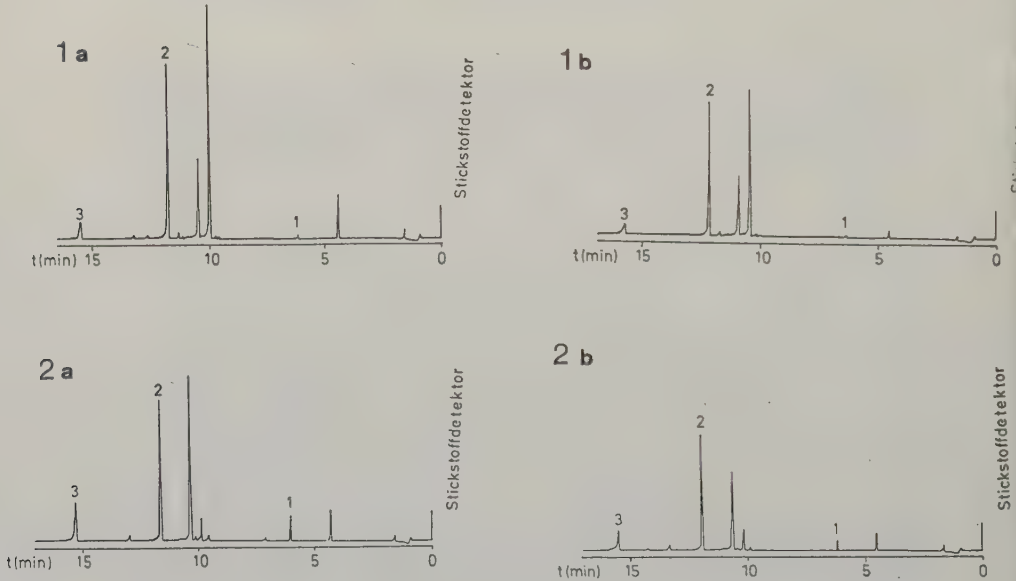


Abb. 52: GC-Messung von Blattextrakten von 1) jungen und 2) alten L. polyphyllus-Blättern; a) Kontrolle und b) mit L-Cadaverin gefüttert, 1.0 g FM/10 ml MES mit 5 x 0.5 mg Cadaverin und 9 mg Pyruvat, nach 24 Stunden. 1. Spartein-, 2. Lupanin-, 3. 4HO-Lupanin-Peak im Stickstoffdetektor des Gaschromatographen.

Zur Überprüfung der Wundinduktion der Alkaloidsynthese, wurden Blätter an der Pflanze verletzt und nach 4 Stunden geerntet und aufgearbeitet. Als Kontrolle dienten unverletzte Blätter, die vorher von der Pflanze abgenommen wurden. Die Extrakte wurden wiederum durch GC-Messung untersucht und die Abbildung 53 zeigt die Alkaloidgehalte der beiden Ansätze.

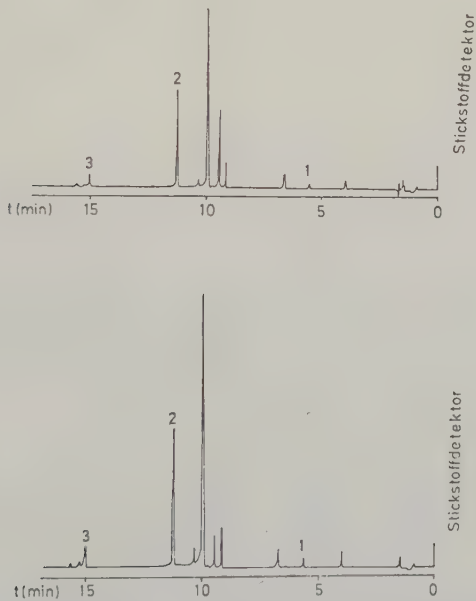


Abb. 53: Alkaloidgehalte von L. polyphyllus-Blättern a) Kontrolle und b) 4 Stunden nach der Verwundung. 1. Spartein- 2. Lupanin- und 3. 4HO-Lupanin-Peak im Stickstoffdetektor des Gaschromatographen.

Die hohe Steigerung der Alkaloidgehalte, besonders des Lupanins (um das 6fache) durch Wundinduktion bei L. polyphyllus (Wink 1983), konnte hier nicht reproduziert werden (Abb. 53).

3.4.3. Einschätzung der Anwendungsmöglichkeit von differenzierten Zellen

Die fehlende bzw. nicht reproduzierbare Induzierbarkeit der Chinolizidin-Alkaloid-Biosynthese in L. polyphyllus-Blättern ließ es nicht sinnvoll erscheinen, das System weiter zu bearbeiten. Es wurde auch diskutiert, ob man die Versuche mit differenzierten, produzierenden Zellen aus anderen Pflanzen und anderen Biosynthesewegen weiterführen sollte. Das habe ich jedoch aufgrund der folgenden Überlegungen abgelehnt.

Wenn man differenzierte Zellen immobilisiert und über einen langen Zeitraum kultivieren will, muß man von sterilem Pflanzenmaterial ausgehen. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, ist es sehr problematisch eine Pflanze nachträglich zu sterilisieren. Solches Material in großen Mengen einzusetzen, ist nahezu aussichtslos, da daß Überleben auch nur einer Bakterien- oder Pilzzelle den Versuch scheitern läßt. Die Anzucht von sterilem Pflanzenmaterial im größeren Maßstab ist meist nur sehr schwer möglich.

Die geringe Ausbeute an Mesophyllzellen bei der Präparation macht deutlich, welche Menge an Pflanzenmaterial für eine technologische Anwendung der differenzierten Zellen notwendig wäre, und mit welchem zeitlichen und technischen Aufwand das verbunden wäre. Vielleicht könnte man mit Blattstücken arbeiten und so die aufwendige Präparation der Mesophyllzellen umgehen. Rentabel könnte beides aber nur sein, wenn man ein System mit einer besonders wertvollen Syntheseleistung findet. Das Produkt müßte auch spontan an das Medium abgeführt werden, damit das Biomaterial weiter verwendet werden kann. Eine Permeabilisation lassen die Ergebnisse mit den anderen Kulturen als nicht aussichtsreich erscheinen.

4. Diskussion

Diese Arbeit hat Probleme bei der Nutzung der Immobilisierungs- und Permeabilisierungsmethoden bei pflanzlichen Zellkulturen zur Steigerung der Produktion von Naturstoffen aufgezeigt, die die positiven Einschätzungen dieser Techniken Anfang der 80er Jahre in Frage stellen. Die Ergebnisse für die drei untersuchten Kulturen erlauben sicher noch keine Aussage über die zu erwartenden Auswirkungen dieser Techniken auf alle pflanzlichen Zellkulturen, aber sie machen deutlich, daß nicht mit jeder immobilisierten Kultur eine Steigerung der Sekundärstoffbildung erreicht wird und daß die Permeabilisierung einer Kultur die Zerstörung des Produktes und/oder den Verlust der Vitalität bedeuten kann. In den letzten Jahren sind auch von anderen Autoren Artikel erschienen, die berechnete Zweifel an der Anwendbarkeit der Techniken äußerten (Adrian et al. 1984, Ruffer 1984). Außerdem ist zu bemerken, daß seit den ersten Arbeiten auf dem Gebiet der Immobilisierung und Permeabilisierung von pflanzlichen Zellen, noch kein Beispiel einer technologischen Anwendung der Methoden realisiert werden konnte.

Aufgrund meiner eigenen Ergebnisse und entsprechender Publikationen, die zu diesem Thema erschienen sind, bin ich zu der folgenden Einschätzung der Anwendbarkeit der Immobilisierungs- und Permeabilisierungstechniken gelangt.

4.1. Immobilisierung einer Kultur zur Steigerung des Sekundärstoffwechsels

Die in dieser Arbeit untersuchten Kulturen wiesen keine erhöhten Sekundärstoffgehalte nach der Immobilisierung auf. Die im Gegensatz dazu stehenden Arbeiten mit anderen Kulturen (Brodelius et al. 1979, Brodelius und Nilsson 1980, Brodelius und Mosbach 1982a, Lindsey und Yeoman 1984, Lindsey 1985) sollen hier näher betrachtet werden.

Bei der Steigerung der Anthrachinonbildung bei immobilisierten M. citrifolia-Zellen, geht nicht eindeutig hervor, ob es eher ein Medieneffekt ist (diese Zellen wurden in einem Produktionsmedium inkubiert), oder auf die Immobilisierung der Zellen zurückzuführen ist (Brodelius und Mosbach 1982a). Der Zweifel an der Gültigkeit dieses Beispiels wird noch durch die Tatsache verstärkt, daß bereits von Zenk et al. (1975) mit M. citrifolia-Zellen ein Anthrachinongehalt von 18% erzielt wurde. Auf dieser Basis kann die 10fache Steigerung der Gehalte bei immobilisierten Zellen (Brodelius und Mosbach 1982a) nicht stattgefunden haben.

Die Steigerung der Ajmalicinbildung bei immobilisierten C. roseus-Zellen von 100% auf 140% (Brodelius und Nilsson 1980, Brodelius und Mosbach 1982b) halte ich ohne zusätzliche Maßnahmen zur Produktabfuhr und Verlängerung der Syntheseleistung als nicht ausreichend für eine technologische Anwendung. Die Matrix verursacht bestimmt Probleme bei der Aufarbeitung der Zellen, die in keinem Verhältnis zu der Erhöhung der Produktion stehen.

Die Steigerung der Capsaicinbildung um das 100fache bei in Polyurethanschäum immobilisierten C. frutescens-Zellen (Lindsey und Yeoman 1984, Lindsey 1985) ist in diesem Zusammenhang das einzige positive Beispiel. Hierbei handelt es sich um eine Kultur, die bereits spontan das Syntheseprodukt in das Medium abgibt (Lindsey 1983). In diesem Fall kommen die Eigenschaften einer Matrix zum Tragen und ermöglichen eine erhöhte und verlängerte Syntheseleistung der Zellen.

Die Abgabe der Produkte in das Medium ist die Voraussetzung für die Anwendung der Immobilisierungstechnik und eröffnet dann eine effektivere und technologische Nutzung des Zellmaterials. Bevor ich näher auf das letztere eingehe, möchte ich diskutieren inwieweit mit der Permeabilisierung einer Kultur diese Voraussetzung geschaffen werden kann.

4.2. Permeabilisierbarkeit von pflanzlichen Zellkulturen

Die meisten sekundären Inhaltsstoffe werden von pflanzlichen Zellen in der Vakuole gespeichert (Wiermann 1981). Durch chemische Permeabilisierung der Plasmamembran und des Tonoplasten können diese Inhaltsstoffe aus den Zellen abgeführt werden (Felix et al. 1981, Felix 1982). Die Alkaloide aus C. roseus werden ebenfalls in der Vakuole gespeichert (Matile et al. 1970, Saunders 1979, Deus und Zenk 1982) und die Permeabilisierung von C. roseus-Zellen mit DMSO (Brodelius und Nilsson 1983, Lundberg et al. 1986) stellt das einzige Beispiel einer erfolgreichen Permeabilisierung einer Kultur mit weiterer Syntheseaktivität dar. Mit dieser Kultur wurde auch die wiederholte Permeabilisierung der Zellen demonstriert (Brodelius und Nilsson 1983).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zur Permeabilisierung pflanzlicher Zellkulturen haben gezeigt, daß eine weitaus höhere Permeabilisierungsmittelkonzentration für eine ausreichende Abgabe der Inhaltsstoffe nötig war, als für C. roseus-Zellen (5% DMSO für 30 Minuten) beschrieben wurde (Brodelius und Nilsson 1983).

Ferner wurde am Beispiel der N. tabacum- und Ch. rubrum-Kultur deutlich, daß labile Inhaltsstoffe im Zuge der Permeabilisierung der Zellen zerstört werden können.

Generell bedeutete eine signifikante Permeabilisation der Kultur eine Schädigung der Zellen, die das Wachstum und die Syntheseleistung stark schädigten. Die permeabilisierten Kulturen hatten erheblich verlängerte lag-Phasen oder waren überhaupt nicht mehr zum Wachstum und zur Produktbildung in der Lage. Dies wurde auch bei der Permeabilisierung von Cinchona ledgeriana-Zellen (Adrian et al. 1984) und Kulturen von Berberis (Rueffer 1984) festgestellt.

Der Unterschied zu den erfolgreichen Permeabilisierungsversuchen mit C. roseus Zellen liegt wahrscheinlich an der gerin-

gen DMSO-Menge die eingesetzt werden mußte, um die Abgabe des Ajmalicins zu erreichen. Es ist denkbar, daß bei C. roseus-Zellen eine besondere Speicherform des Ajmalicins vorliegt. Wenn ein Austausch des Ajmalicins zwischen Vakuole und Cytoplasma in der intakten Zelle möglich ist, ist für die Abgabe nur die Permeabilisierung der Plasmamembran erforderlich. Delmer (1979) hat gezeigt, daß für die Permeabilisierung des Tonoplasten höhere DMSO-Konzentrationen als für die Plasmamembran erforderlich sind. Zellen, die ihre Inhaltsstoffe in der Vakuole speichern, müssen also stärker permeabilisiert werden, was zur erheblichen Schädigung der Vitalität führen kann. Ob bei einer chemischen Behandlung auch der Tonoplast permeabilisiert wurde, kann durch die in vivo-³¹P-NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Lundberg et al. (1986) hat mit dieser Methode die vollständige Permeabilisierung auch des Tonoplasten bei C. roseus-Zellen durch DMSO demonstriert. Insgesamt waren die Ergebnisse mit permeabilisierten C. roseus-Zellen so beeindruckend, daß ich den Versuch von Lundberg et al. (1986) mit einer C. roseus-Kultur, die in der Abteilung Pflanzliche Zellkulturen der GBF seit mehreren Jahren bearbeitet wird, während des Zusammenschreibens meiner Ergebnisse wiederholt habe. Diese Untersuchungen basierten auf der Tatsache, daß Phosphat schnell von C. roseus-Zellen aufgenommen und in der Vakuole gespeichert wird (Wray et al. 1983, Vogel und Brodelius 1984, Brodelius und Vogel 1984, 1985). Die Abbildung 53 gibt die ³¹P-NMR-Spektren wieder, die ich für die Kontrollprobe und die unterschiedlich permeabilisierten C. roseus-Zellen erhalten habe. Der Peak bei einer chemischen Verschiebung zwischen 1 und 2 PPM entspricht dem Phosphatgehalt der Vakuole.

Aus den Spektren geht hervor, daß mit der Permeabilisierung, wie sie von Brodelius und Nilsson (1983) und Lundberg et al. (1986) durchgeführt wurde, mit dieser Zelllinie nur eine weit- aus geringere Menge Phosphat aus der Vakuole ausgeflossen war (Abb. 53b). Erst nach einer erheblichen Verlängerung der Permeabilisierungszeiten und nach weiterer Inkubation der Zellen (Abb. 53e) war der Phosphatgehalt der Vakuole auf das Maß re-

duziert worden, das Lundberg et al. (1986) bereits bei 5% DMSO und einer Permeabilisierungsdauer von 30 Minuten erzielt hatten.

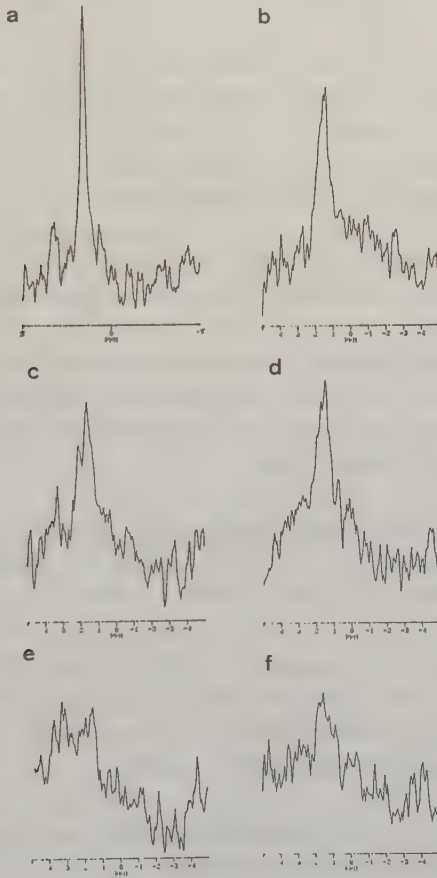


Abb. 53: ^{31}P -NMR-Spektren von C. roseus-Zellen, die den Phosphatgehalt der Vakuole wiedergeben: a) unbehandelte, b) mit 5% DMSO für 30 Minuten, c) mit 5% DMSO für 1 Stunde, d) mit 5% DMSO für 2 Stunden, e) mit 5% DMSO für 2 Stunden permeabilisiert und weitere 2 Stunden im frischen MX-Medium inkubiert und f) Zellen, die wie unter (d) beschrieben behandelt wurden, für 30 Stunden im neuen Medium inkubiert und dann gemessen wurden.

Die Schädigung der Zellen durch die Permeabilisierung wird an der Tatsache deutlich, daß die behandelten Zellen 30 Stunden nach der Permeabilisierung nicht den normalen Phosphatgehalt in der Vakuole aufwiesen (Abb.53f).

Für die in der Abteilung Pflanzliche Zellkulturen etablierte C. roseus-Kultur war eine erheblich stärkere Permeabilisierung nötig. Das deutet darauf hin, daß selbst bei verschiedenen Zelllinien einer Kultur signifikante Unterschiede in der Permeabilisierbarkeit möglich sein können.

Die chemische Permeabilisierung pflanzlicher Zellkulturen führte nur in dem Einzelfall zur ausreichenden Abgabe der Inhaltsstoffe unter Erhaltung der Vitalität der Zellen. Die meist ungenügende Permeabilisierung einer Kultur mit geringen Mengen chemischer Agenzien kann durch die Zellmorphologie, das Wachstumsverhalten oder die Speicherform von Inhaltsstoffen einer Kultur bedingt sein.

Die Aufhebung der Kompartimentierung der Zellen durch die Permeabilisierung birgt auch die Gefahr, daß Inhaltsstoffe durch freiwerdende unspezifische Enzyme zerstört werden. Dieser Effekt kann aber auch, wie am Beispiel von leicht permeabilisierten N. tabacum-Zellen gezeigt wurde, zur Akkumulation von neuen Verbindungen führen. Als immobilisierte Enzymreaktoren könnten permeabilisierte Zellkulturen für Biotransformationsleistungen genutzt werden.

4.3. Aussichtsreiche Anwendungsmöglichkeiten der Immobilisierungs- und Permeabilisierungsmethoden

Als aussichtsreich erachte ich die Immobilisierung von Kulturen, die ihre Inhaltsstoffe spontan ausscheiden oder deren Biotransformationsprodukte im Medium vorliegen (z.B. Alfermann et al. 1980, Veliky und Jones 1981, Wichers et al. 1983, Wichers et al. 1985). Die Anzucht des Zellmaterials würde nach wie vor mit frei suspendierten Zellen erfolgen, die zur Produktion in geeigneter Form immobilisiert und in einem

Produktionsmedium inkubiert würden. Für solche Kulturen bietet die Immobilisierung der Zellen erhebliche Vorteile für ihre technologische Anwendung (Shuler et al. 1983, Shuler et al. 1986). Die stabilisierende Wirkung der Immobilisierung geht auch aus den Ergebnissen dieser Arbeit hervor. Ferner bietet der Schutz der Zellen vor Streß, eine definierte Zellverteilung, kein Auswaschen der Zellen bei kontinuierlicher Kulturführung und die leichte Abtrennung des Mediums, bzw. des Produktes von den Zellen bessere Voraussetzungen für die Kultivierung in Rührkessel- oder Festbettreaktoren. Als weitere Immobilisierungsmöglichkeit ist der Einschluß in Membranen erfolgversprechend (Jose et al. 1982, Shuler et al. 1982, Shuler et al. 1986) und eröffnet zusätzliche technologische Möglichkeiten.

Als universelle Methode zur Induktion oder Erhöhung von Sekundärstoffsynthesen bei pflanzlichen Zellkulturen ist die Immobilisierung leider nicht geeignet. Hier müßte eher auf der Ebene der Zellregulation weitergearbeitet werden. Die Immobilisierung bringt in erster Linie Vorteile bei der technologischen Umsetzung von Prozessen wie sie oben skizziert wurden.

Die chemische Permeabilisierung von pflanzlichen Zellen halte ich nur in Einzelfällen für aussichtsreich und dann nur im Bereich von Teilsynthesen oder Biotransformationen. Auch bei dem Paradebeispiel einer permeabilisierten Kultur (C. roseus) wird das Ajmalicin nur aus gefüttertem Tryptamin und Secologanin gebildet (Brodelius und Nilsson 1983). Es bleibt zu prüfen, ob man mit anderen Methoden, wie z.B. einem pH-Wechsel (Renaudin 1981) erfolgreicher permeabilisieren kann.

4.4. Problematik bei der Nutzung von differenzierten Zellen

Nach meiner Erfahrung sehe ich bei der Nutzung von differenzierten Zellen zur Naturstoffproduktion die Probleme eher in der Bereitstellung ausreichender Mengen an sterilen Zellen, als bei der Suche nach einem geeigneten Zellsystem mit hoher

Sekundärstoffexpression. Die Massenzucht von sterilen Pflanzen und die sterile Isolierung der Zellen würde einen enormen Aufwand bedeuten, der nur durch besonders hochwertige Produkte gerechtfertigt werden kann. Als Alternative zur sterilen Anzucht von Pflanzen könnten Organkulturen oder differenzierte Zellkulturen in Erwägung gezogen werden. Die Zellen könnte man vielleicht durch entsprechende enzymatische Behandlung gewinnen. Die Immobilisierung von differenzierten Zellen trägt sicherlich zur Stabilisierung der Syntheseleistung bei und erlaubt aufgrund der unter 5.3. aufgeführten Eigenschaften einer Matrix den Einsatz von technologisch notwendigen Verfahren zur Massenproduktion von Naturstoffen.

5. Zusammenfassung

Die Produktion von Naturstoffen mit pflanzlichen Zellkulturen wird allgemein angestrebt. Da aber in vielen Fällen nur eine geringe Sekundärstoffbildung bei pflanzlichen Zellkulturen stattfindet, verspricht man sich von der Immobilisierung einer Kultur einige Vorteile, die eine technologische Anwendung des Systems zur Naturstoffproduktion ermöglichen könnten. Die Wirkung der Matrix auf die Zellen sollte z.B. eine Verstärkung des Sekundärstoffwechsels, die Stabilisierung von Syntheseleistungen und das Spontane Ausscheiden von Produkten bewirken. Durch Permeabilisierung der Zellen sollte, wenn nötig, letzteres erreicht werden, wobei besonders die Stabilität der Produkte erforderlich ist. Die Regenerationsfähigkeit der Zellen, die ihre Inhaltsstoffe abgegeben hatten, sollte überprüft werden.

An verschiedenen Zellkulturen mit Sekundärmetaboliten unterschiedlicher Stoffklassen, wurde in dieser Arbeit die Anwendungsmöglichkeit der Immobilisierungs- und Permeabilisierungstechnik zur Verbesserung der Sekundärstoffbildung mit pflanzlichen Zellkulturen untersucht.

Als ein neuer Ansatzpunkt in der Problematik der Naturstoffproduktion mit pflanzlichen Zellen, wurde die Verwendungsmöglichkeit von differenzierten Zellen geprüft, denn bei ihnen ist eine starke Expression des Sekundärstoffwechsels zu erwarten.

1) Die Immobilisierung der verschiedenen Zellkulturen in Alginat führte zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen und bestätigt die breite Anwendungsmöglichkeit dieser Matrix bei pflanzlichen Zellen.

2) In allen untersuchten Systemen lief die de-novo Synthese der Sekundärmetabolite auch in den immobilisierten Zellen. Aber es wurde keine verstärkte Sekundärstoffbildung durch die Immobilisierung erreicht.

3) Die Sekundärmetabolite konnten auch von immobilisierten Zellen im gleichen Umfang wie von freien aus Vorstufen synthetisiert werden. Die Aufnahme dieser Vorstufen war für immobilisierte Zellen nur leicht verzögert.

4) Die Immobilisierung führte nur bei der *Th. rugosum*-Kultur zu einer spontanen Abgabe der Alkaloide in das Medium. Allerdings war der Anteil der freien Alkaloide mit 10% an der Gesamtmenge noch sehr gering und nicht ausreichend für eine technologische Anwendung.

5) An den verschiedenen Kulturen wurde anhand der Biosyntheseleistungen der stabilisierende Einfluß der Matrix auf die Systeme deutlich. Dies zeigte sich besonders bei der längeren Aufnahmefähigkeit der Vorstufen und deren Einbau in die Sekundärmetabolite durch immobilisierte Zellen.

6) Mit der Permeabilisierung von Zellen konnten 80-90% der Inhaltsstoffe freigesetzt werden. Dazu war jedoch eine recht erhebliche Menge an Permeabilisierungsmittel (20-30%) nötig. Diese stark permeabilisierten Zellen wuchsen nicht mehr an und produzierten keine Sekundärmetabolite. Eine Permeabilisierung mit starker Ausschleusung muß nach den hier beschriebenen Erfahrungen eher als eine Extraktion der Zellen angesehen werden.

Zellen, die mit geringen Mengen an Permeabilisierungsagentien behandelt wurden, schieden 20-30% ihrer Inhaltsstoffe aus, aber diese Zellen hatten im Anschluß daran eine zum Teil recht erheblich verlängerte lag-Phase und die Produktausbeuten waren geringer. Die geringe Ausscheidung

und die verminderte Produktion lassen die Anwendung der Permeabilisierung zur Steigerung der Naturstoffproduktion als fraglich erscheinen.

7) Am Beispiel der permeabilisierten Tabakkultur wurde zum ersten Mal gezeigt, daß labile Produkte (Cinnamoylputrescine) durch die Aufhebung der Kompartimentierung zerstört werden können.

8) Leicht permeabilisierte Tabakzellen waren zu neuen Biosyntheseleistungen in der Lage. Im Medium dieser permeabilisierten Zellen akkumulierten nach der Fütterung mit Phenylalanin Vorstufen der Ligninsynthese, die sonst in den Kulturen nicht gebildet oder gefunden wurden. Mit der Permeabilisierung eröffnet sich vielleicht eine Erweiterung der Bitransformationskapazität von pflanzlichen Zellen.

9) Die Regenerierbarkeit von permeabilisierten Zellen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Beobachtungen sprechen jedoch für die Wahrscheinlichkeit, daß die anschließende lag-Phase bei permeabilisierten Zellen auf eine Extraktion eines Teiles der Zellpopulation zurückzuführen war.

10) Die Arbeit mit differenzierten Zellen wurde nicht fortgesetzt, da eine technologische Nutzung dieses Systems, nach einer Abschätzung der Aufwendungen zur Bereitstellung ausreichender Mengen von sterilen differenzierten Zellen, nicht sehr aussichtsreich ist.

6. Literaturverzeichnis

- Adrian, J.P., Robins, R.J., Rhodes, M.J. (1984);
Plant Cell Rep. 3, 262-265.
- Alfermann, A.W., Boy, H.M., Döller, P.C., Hagedorn, W.,
Heins, W., Wahl, J., Reinhard, E. (1977),
In: "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological
Application" (W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk, eds.)
pp 125-141, Springer Verlag Berlin und New York.
- Alfermann, A.W., Schuller, I., Reinhard, E. (1980),
Planta Medica 40, 218-223.
- Amorim, H.V., Dougall, D.K., Sharp, W.R. (1977);
Physiol. Plant. 39, 91.
- Barz, W., Ellis, B.E. (1981),
Ber. Dt. Bot. Ges. 94, 1.
- Bajaj, Y.P.S. (1976);
Physiol. Plant. 37, 263.
- Berlin, J. (1981);
Phytochemistry 20, 53-
- Berlin, J. (1986);
In: "Biotechnology" (Ed. H.-J. Rehm, G. Reed) VCH
Verlagsgesellschaft, Weinheim. Vol. 4, 629-658.
- Berlin, J., Beier, H., Fecker, L., Forche, E., Noe, W.,
Sasse, F., Schiel, O., Wray, V. (1985);
In: "Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell
Culture" (Ed. K.H. Neumann et al.) Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg. p.272.

- Berlin, J., Bode, J. (1982);
 In: "Handbuch der Biotechnologie" (P. Präve, K. Faust,
 W. Sittig, D.A. Sukatsch, Hrsg.), Akademische Verlags-
 gesellschaft.
- Berlin, J., Forche, E., Wray, V., Hammer, J., Hösel, W.
 (1983);
 Z. Naturforschung 38c, 346-352.
- Berlin, J., Knobloch, K.-H., Höfle, G., Witte, L. (1982);
 J. of Nat. Prod., Vol. 45 No. 1, 83-87.
- Berlin, J., Sasse, F. (1985);
 Adv. Biochem. Eng. 31, 99
- Berlin, J. Sieg, S., Strack, D., Bokern, M., Harms, H.
 (1986);
 Plant Cell Organ Tissue Culture 5, 163-174
- Berlin, J., Widholm, J.M. (1977);
 Plant Physiol. 59, 550.
- Berlin, J., Widholm, J.M. (1978a);
 Phytochemistry 17, 65
- Berlin, J., Widholm, J.M. (1978b);
 Z. Naturforschung 33c, 634
- Berlin, J., Witte, L. (1982);
 J. Nat. Prod. 45, 88-93.
- Berlin, J., Witte, L., Hammer, J., Kukoschke, K.G., Zimmer,
 A., Pape, D. (1982);
 Planta 155, 244-250.

- Böhm, H. (1978);
In: "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978 (Thorpe, T.A. ed.), University of Calgary Offset Printing Services, Alberta, Canada, 201-211.
- Brodelius, P. (1983),
Ann. N.Y. Acad. Sci. 413, 383-393.
- Brodelius, P. (1985),
Trends in Biotechnology Vol. 3 No. 11, 280-285.
- Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K., Zenk, M.H. (1979),
FEBS Lett. Vol. 103, 1, 93-97.
- Brodelius, P., Mosbach, K. (1982a),
J. Chem. Tech. Biotechnol. 32, 330-337.
- Brodelius, P., Nilsson, K. (1980),
FEBS Lett. Vol. 122, 2, 312-316.
- Brodelius, P., Nilsson, K. (1983),
Europ. J. Appl. Microbial Biotech. 17, 275-280.
- Brodelius, P., Vogel, H.J. (1984),
Ann. N.Y. Acad. Sci. 434, 496-500.
- Brodelius, P., Vogel, H.J. (1985),
J. Biol. Chem. 260, 3556-3560.
- Bucke, C., Wiseman, A. (1981),
Chemistry and Industry 4, 234-240.
- Bu' Lock (1970),
Biosynthese von Naturstoffen, BLV, München.

- Butcher, D.N., Conolly, J.D. (1971);
J. Exp. Bot. 22, 314-322.
- Charles, M., Coughlin, R.W., Allen, B.R., Parchuri, E.K.,
Hasselberger, F.X. (1973), In: "66th. Annual Meeting of
the Am. Inst. of Chem. Eng., Philadelphia, Paper 17b,
Stärke 58/51.
- Chiabata, I. (1980),
In: "Enzyme Engineering in Food Processing" (P. Linko,
J. Lrinkari, eds.)Vol. 2, 1-26, Appl. Sci. Publ.,
Barking.
- Czapek, F. (1920/21),
Biochemie der Pflanzen, Fischer Verlag, Jena.
- De-Eknamkul, W., Ellis, B.E. (1984),
Planta Medica 51, 346.
- Davey, M.R. (1983),
In: "Protoplasts 1983", Experienta Suppl. 46, 19.
- Delmer, D.P. (1979);
Plant Physiol. 64, 623-629.
- Deus, B. (1978),
In: "Production of Natural Compounds by Cell Culture
Methods", (A.W. Alfermann, E. Reinhard, Hrsg.) 118,
BPT-Report, München.
- Deus-Neumann, B., Zenk, M.H. (1984),
'Planta Medica 50, 427.
- Deus, B., Zenk, M.H. (1982),
Biotechnol. Bioengin. 24, 1965.

- DiCosmo, F., Misawa, M. (1985),
Trends in Biotechnology 3, 318-322.
- Dougall, D.K., Wetherell, D.F. (1974),
Cryobiology 11, 410-415.
- Felix, H.R. (1982),
Analytical Biochemistry 120, 211-234.
- Felix, H.R., Brodelius, P., Mosbach, K. (1981),
Analytical Biochemistry 116, 462-470.
- Felix, H.R., Mosbach, K. (1982),
Biotechnology Letters Vol. 4, 3, 181-186.
- Filner, P. (1965);
Exp. Cell Res. 39, 33.
- Flores, H.E., Filner, P. (1985),
In: "Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Culture" (ed. K.H. Neumann et al); Springer Verlag 174.
- Fowler, M.W. (1984),
Biotechn. Gen. Eng. Rev. 2, 41-67.
- Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T., Saga, C. (1981a),
Plant Cell Rep. 1, 59.
- Fujita, Y., Hara, Y., Saga, C., Marimoto, T. (1981b),
Plant Cell Rep. 1, 61-65.
- Fujita, Y., Nakagawa, K., Tsuda, S., Tabata, M. (1984),
In: "Third European Congress on Biotechnology",
Verlag Chemie, Weinheim-Basel, Vol. I, 161.

- Fujita, Y., Tabata, M., Nishi, A., Yamada, Y. (1982),
In: "Plant Tissue Culture", (A. Fujiwara, Hrsg.),
Maruzen Press, Tokyo, 399.
- Fukui, H., Nakagawa, K., Tsuda, S., Tabata, M. (1982);
In: "Plant Cell Culture 1982" (Fujiwara, A. Hrsg.),
Maruzen Press, Tokyo, 313.
- Furuya, T., Ikuta, A., Syono, K. (1972),
Phytochemistry 11, 2175.
- Galun, E., Aviv, D., Dantes, A., Freeman, A. (1983),
Planta Medica 44, 9-13.
- Garve, R., Luckner, M., Vogel, E., Tewes, A., Nover, L.
(1980),
Planta Medica 40, 92.
- Gupta, Prem.P. (1986),
Plant Science, 43, 151-154.
- Hamilton, R., Pedersen, H. (1984);
Biotechnology and Bioengineering Symp. No. 14, 383-395.
- Harms, H., Dehnen, W., Mönch, W. (1977),
Z. Naturforsch. 32c, 321-326.
- Hartmann, T., Schoofs, G., Wink, M. (1980),
FEBS-Lett. 115, 35-38.
- Hashimoto, T., Yamada, Y. (1983),
Planta Medica 47, 195.
- Hinz, H., Zenk, M.H. (1981),
Naturwissenschaften 67, 620-621.

- Hulst, A.C., Tramper, J., Riet, K. van't, Westerbeck, J.M.M.
(1985); *Biotech. and Bioeng.* 27, 870-876.
- Ikuta, A., Itokawa, H. (1982),
Phytochemistry 21, 1419-1420.
- Ikuta, A., Soyono, K., Furuya, T. (1974),
Phytochemistry 17, 1879.
- Jones, A., Veliky, I.A. (1981a),
European J. Appl. Microb. Biotech. 13, 84-89.
- Jones, A., Veliky I.A. (1981b),
Planta Medica 42, 160-166.
- Jones, A., Veliky, I.A., Ozubko, R.S. (1978),
Lloydia 41, 476-487.
- Jose, W., Pedersen, H., Chee-Kok, C. (1982),
Ann. N.Y. Acad. Sci. 413, 409-412.
- Knobloch, K.-H., Berlin, J. (1980),
Z. Naturforsch. 35c, 551-556.
- Knobloch, K.-H., Berlin, J. (1981a);
Planta medica 42, 167-172.
- Knobloch, K.-H., Hansen, B., Berlin, J. (1981b),
Z. Naturforschung 36c, 40-43.
- Kohl, W., Witte, B., Höfle, G. (1982),
Z. Naturforschung 37b, 1346.
- Kondo, Y. (1976),
Heterocycles 4, 197-219.

- Krueger, R.J., Carew, D.P. (1978),
Lloydia 41, 327-331.
- Kubek, D.J., Shuler, M.L. (1980a);
Lloydia 43, 87.
- Kubek, D.J., Shuler, M.L. (1980b),
J. Nat. Prod. 43, 87-96.
- Kutchan, T.M., Ayabe, S., Krueger, R.J., Coscia, E.M.,
Coscia, C.J. (1983),
Plant Cell Rep. 2, 281.
- Kutney, J.P., Aweryn, B., Choi, L.S.L., Honda, T.,
Kolodziejczyk, P., Lewis, N.G., Sato, T., Sleigh, S.K.
Stuart, K.L., Worth, B.R., Kurz, W.G.W., Chatson, K.B.
Constabel, F. (1983),
Tetrahedron 39, 3781-3795.
- Lee, Y.Y., Wun, K., Tsao, G.T. (1974),
77th Nat. Meeting of the Am. Inst. of Chem. Eng.,
Pittsburg, Paper 11a.
- Lindsey, K. (1985),
Planta 165, 126-133.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M. (1983),
J. Exp. Bot. 34, 1055-1065.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M. (1984),
Planta 162, 495-501.
- Lindsey, K., Yeoman, M.M., Black, G.M., Mavituna, E. (1983),
FEBS. Lett. Vol. 155, 1, 143-149.

- Linsefors, L., Brodelius, P. (1985),
Plant Cell Rep. 4, 23-27.
- Lundberg, P., Linsefors, L., Vogel, H.J., Brodelius, P.
(1986),
Plant Cell Reports 5, 13-16
- Luckner, M. (1984),
Secondary Metabolism in Plants and Animals,
Chapman and Hall Ltd. London.
- Matile, P., Jans, B., Richenbacher, R. (1970),
Biochem. Physiol. Pflanzen. 161, 447-458.
- Misawa, M. (1985),
Adv. Biochem. Eng., 31, 59-88.
- Mizusaki, S., Tanabe, Y., Noguchi, M., Tamaki, E. (1971);
Phytochemistry 10, 1347.
- Morris, P., Fowler, M.W. (1981),
Plant Cell Tissue and Organ Culture 1, 15-24.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962);
Physiol. Plant. 15, 473.
- NaKagawa, K., Konagai, A., Fukui, H., Tabata, M. (1984),
Plant Cell Rep. 3, 254-257.
- Nash, D.T., Davies, M.E. (1972);
J. Exp. Bot. 23, 75.
- Nilsson, K., Birnbaum, S., Flygare, S., Linse, L., Schröder,
U., Jeppsson, U., Larsson, P.-O., Mosbach, K. Brodelius,
P. (1983),
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17, 319-326.

- Palmer, J.E., Widholm, J.M. (1975);
Plant Physiol. 56, 233-238.
- Phillips, R., Henshaw, G.G. (1977);
J. Exp. Bot. 28, 785.
- Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Poupet, A., Marais, A.,
Beck, D. (1982); J. Chromatogr. 240, 398-404.
- Razzaque, A., Ellis, B.E. (1977),
Planta 137, 287.
- Reinhard, E., Alfermann, A.W. (1980),
Ad. in Biochem. Eng. 16, 49-81.
- Rhodes, M.J.C. (1985);
Topics Enzymology Fermentation 10, 51-87.
- Rhodes, M.J.C., Kirsop, B.H. (1982),
Biologist 29, 134-140.
- Rosevear, A., Lambe, C.A. (1985);
Adv. in Biochem. Eng./Biotech. 31, 37-58.
- Roustan, J.-P., Ambid, C., Fallot, J. (1982),
Physiol. Veg. 20, 523-532.
- Rüffer, M. (1984);
Proceedings of the Phytochemical Society of Europe;
Vol. 24, The chemistry and Biology of Isoquinoline
Alkloids (in Press).
- Sato, F., Endo, T., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1982);
In: "Plant Tissue Culture 1982" (Fujiwara, A. Hrsg.)
Maruzen Press, Tokyo, 319.

- Sato, F., Yamada, Y. (1984);
Phytochemistry 23, 281-285.
- Saunders, J.A. (1979),
Plant Physiol. 64, 74-78.
- Schnabel, H., Youngman, R.J. (1985);
Plant Science 40, 65-69.
- Schuchmann, R., Wellmann, E. (1983),
Plant Cell Rep. 2, 88.
- Sieg, S. (1983);
Diplomarbeit an der Technischen Universität Braunschweig
- Shargool (1982),
Appl. Biochemistry and Biotechnology 7, 239-257.
- Shuler, M.L., Hallsby, G.A., Pyne, J.W., Cho, J.R. und T
(1986),
Ann. N.Y. Acad. Sci. 469, 270-278.
- Shuler, M.L., Sahai, O.P., Hallsby, G.A. (1983),
Ann. N.Y. Acad. Sci. 413, 373-382.
- Stöckigt, J., Treimer, J., Zenk, M.H. (1976),
FEBS. Lett. 70, 267-270.
- Stöckigt, J., Husson, H.P., Kan-Fan, C., Zenk, M.H. (1977),
JCS Chem. Commun. 164-166.
- Stöckigt, J., Soll, H.J. (1980),
Planta Medica 40, 22.
- Tabata, M., Mizukami, H., Hiraoka, N., Kouoshima, M. (1974),
Phytochemistry 13, 927.

- Tam, W.H.J., Constabel, F., Kurz, W.G.W. (1986),
Phytochemistry 19, 486.
- Teuscher, E. (1975),
Pharmakognosie Teil 2, Reihe Wissenschaften, Vieweg
Braunschweig.
- Veliky, I.A., Jones, A., Ozubko, R.S., Przybylska, M.
Ahmed, F. (1980),
Phytochemistry 19, 2111-2112.
- Veliky, I.A., Jones, A. (1981),
Biotechnology Letters Vol. 3 No 10, 551-554.
- Vogel, H.J., Brodelius, P. (1984),
J. Biotech. 1, 159-170.
- Wagner, H., Lin, L.-Z., Seligmann, O. (1984);
Planta Medica, 14-16.
- Weiler, E.W. (1977),
In: "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological
Application", (Barz et al. eds.) 266-277, Springer-
Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Whittaker, R.H., Feeny, P.P. (1971),
Science 171, 757.
- Wichers, H.J., Malingre, T.M., Huizing, H.J. (1983),
Planta 158, 482-486.
- Widholm, J.M. (1972),
Stain Technol. 47, 189-194.
- Wichers, H.J., Malingre, T.M. Huizing, H.J. (1983),
Planta 158, 482-486.

- Wichers, H.J., Malingre, T.M., Huizing, H.J. (1985),
Planta 166, 421-428.
- Wiermann, R. (1981),
 In: "The Biochemistry of Plants- A comprehensive
 treatise", (ed. E.E. Conn) (Secondary Plant Products
 Vol. 7) Acad. Press. 86-116.
- Wink, M., Hartmann, T. (1980a);
Planta Medica 40, 149-155.
- Wink, M., Hartmann, T. (1980b);
Z. Pflanzenphysiologie 102, 337-344.
- Wink, M., Witte, L., Schiebel, H.M., Hartmann, T. (1980);
Planta Medica 38, 238-245.
- Wray, V., Schiel, O., Berlin, J. (1983),
Z. Pflanzenphysiol. 112, 215-220.
- Yamanda, Y., Hashimoto, T. (1982),
Plant Cell Rep. 1, 101.
- Yoshikawa, Y., Furuya, T. (1982),
 In: "Plant Tissue Culture 1982", (Fujiwara, A., Hrsg.)
 Maruzen Press, Tokyo, S. 307.
- Zenk, M.H., El-Shagai, H., Schulte, U. (1975),
Planta Med. Suppl. 79-101.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H. Ulbricht, B. (1977a),
Naturwissenschaften 64, 585.

- Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, H., Stöckigt, H., Weiler, E.W., Deus, B. (1977b),
In: "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Applications", (Barz, W. eds.), 27-43, Springer-Verlag, Berlin, New York.
- Zenk, M.H. (1978),
In: "Frontiers of Plnt Tissue Culture", (T.A. Thorpe ed.), 1-13, International Association for Plant Tissue Culture.
- Zenk, M.H., Deus, B. (1982),
Plant Tissue Culture, (Fujiwara, A. ed.), Maruzen Co, Tokyo 391-394.

Herrn Prof. Dr. R. Megnet danke ich für die Bereitstellung des Themas.

Ich danke Herrn Dr. J. Berlin für seine ständige Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit. Für die GC-MS-Untersuchungen möchte ich mich bei Herrn Dr. L. Witte bedanken, ebenso bei Herrn Dr. V. Wray für die NMR-Spektroskopien.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Bernd Martin

(Bernd Martin)

LEBENS LAUF

Name: Bernd Martin
geb. am: 25.12.52 in Verden/Aller
Eltern: Lieselott Martin geb. Kamswich
Ulrich Martin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: Hauptschule in Bremen 1960-1966
Realschule in Bremen 1966-1969
Gymnasium in Bremen 1969-1973

Wehrdienst: Soldat auf Zeit 10.73-07.75
(Unteroffizier)

Berufsausbildung:

Studium der Biologie an der
Universität Oldenburg 10.75-02.82
Betriebspraktikum bei
Hoffmann La Roche, Basel 01.80-03.80
Diplomarbeit in der Gesellschaft
für Biotechnologische Forschung
in Braunschweig 01.81-12.81
Diplomhauptprüfung 01.82
Wissenschaftliche Hilfskraft in der
Abteilung "Pflanzliche Zellkulturen"
der Gesellschaft für Biotechnologische
Forschung mbH mit dem Ziel der
Promotion 03.82-02.85

